

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 162**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.1999 E 99935052 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 1103812**

54 Título: **Método para determinar hemoglobinas**

30 Prioridad:

07.08.1998 JP 22457298

07.08.1998 JP 22457398

07.08.1998 JP 22457498

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.03.2016

73 Titular/es:

SEKISUI CHEMICAL CO., LTD. (100.0%)

4-4, NISHITENMA 2-CHOME, KITA-KU

OSAKA-SHI, OSAKA 530-8565, JP

72 Inventor/es:

SETOGUCHI, YUJI;

OISHI, KAZUYUKI;

SHIMADA, KAZUHIKO;

KAWABE, TOSHIKI y

OKA, TAKAYUKI

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 563 162 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar hemoglobinas.

5 CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un método para determinar hemoglobinas, dirigido específicamente a determinar hemoglobina estable A_{1c} mediante cromatografía de líquidos de intercambio catiónico.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La hemoglobina A_{1c} (en lo sucesivo abreviada como HbA_{1c}) ha sido enumerada frecuentemente como un elemento de ensayo en un ensayo de cribado de diabetes mellitus o como un elemento de ensayo para entender lo bien que está controlada la glucemia de los diabéticos, dado que su relación por composición con respecto a todas las hemoglobinas refleja una glucemia promedio (concentración de glucosa en sangre) durante los 1 - 2 meses precedentes.

15 HbA_{1c} es glucohemoglobina (en lo sucesivo abreviada como GHb) producida mediante una reacción entre glucosa y hemoglobina A (en lo sucesivo abreviada como HbA) presente en la sangre. La HbA_{1c}, si se produce mediante una reacción reversible entre ellas, se denomina HbA_{1c} lábil y, si se produce mediante una reacción irreversible que implica la HbA_{1c} lábil, se denomina HbA_{1c} estable.

20 Normalmente, la hemoglobina es una proteína tetramérica compuesta por dos pares de dos subunidades diferentes. La HbA tiene subunidades de cadena α y cadena β . La unión de glucosa a uno o más aminoácidos N-terminales de esta/estas cadenas β da como resultado HbA_{1c}. La HbA_{1c} estable refleja mejor una glucemia promedio durante los 1 - 2 meses precedentes. En el campo de los ensayos clínicos, se ha demandado desarrollar un método mediante el cual el nivel de HbA_{1c} estable (%) pueda medirse con elevada precisión.

25 Los métodos de determinación de HbA_{1c} convencionales emplean, en su mayoría, cromatografía de líquidos (en lo sucesivo abreviada como LC) que, de acuerdo con una técnica de intercambio catiónico, separa las hemoglobinas presentes en una muestra preparada eluyendo hemolíticamente una muestra de sangre tomando como base la diferencia del estado cargado positivamente entre hemoglobinas (por ejemplo, publicación de patente japonesa N.º Hei 8-7198).

30 La separación de hemoglobinas presentes en la muestra hemolizada por medio de LC de intercambio catiónico, si se realiza durante un periodo de tiempo suficientemente largo, generalmente da como resultado la elución secuencial de hemoglobina A_{1a} (en lo sucesivo abreviada como HbA_{1a}) y hemoglobina A_{1b} (en lo sucesivo abreviada como HbA_{1b}), hemoglobina F (en lo sucesivo abreviada como HbF), HbA_{1c} lábil, HbA_{1c} estable y hemoglobina A₀ (en lo sucesivo abreviada como HbA₀). HbA_{1a}, HbA_{1b} y HbA_{1c} son, cada una, GHb en forma de HbA glucosilada. HbF es hemoglobina fetal compuesta por cadenas α y γ . HbA₀ consiste en un grupo de componentes de hemoglobina, incluye HbA como su componente principal y es retenida más fuertemente en una columna que HbA_{1c}.

35 Las técnicas anteriores han padecido las siguientes deficiencias: la separación de HbA_{1c} lábil de HbA_{1c} estable es insuficiente; y "hemoglobinas modificadas", tales como hemoglobina acetilada (en lo sucesivo abreviada como AHb) y hemoglobina carbamilada (en lo sucesivo abreviada como CHb), se eluyen junto con HbA_{1c} estable.

40 Es decir, en la determinación de hemoglobinas presentes en una muestra de sangre, principalmente con el fin de medir un nivel de HbA_{1c} estable (%) mediante LC de intercambio catiónico, ha sido difícil separar picos de HbA_{1c} lábil, AHb y CHb de una HbA_{1c} estable sin afectar a la medición del nivel de HbA_{1c} estable, dado que sus comportamientos de elución se asemejan entre sí.

La hemoglobina S (en lo sucesivo abreviada como HbS) y la hemoglobina C (en lo sucesivo abreviada como HbC) son conocidas como "hemoglobinas anormales". HbS y HbC resultan de la sustitución de ácido glutámico ubicado en una sexta posición desde un extremo N de la cadena β de HbA por valina y lisina, respectivamente.

45 La hemoglobina A₂ (en lo sucesivo abreviada como HbA₂) está compuesta por cadenas α y δ y, como HbF, su nivel elevado se interpreta como indicio de anemia mediterránea (talasemia).

En la determinación normal de hemoglobinas mediante LC de intercambio catiónico, éstas se eluyen en la secuencia de HbA₀, HbA₂, HbS y HbC.

50 En la determinación de HbA_{1c} estable presente en una muestra que también contiene HbS, HbC u otras hemoglobinas anormales, se requiere que los picos de estas hemoglobinas se separen de un pico de HbA₀ y que el nivel de HbA_{1c} estable (%) se determine calculando una relación del área de un pico de HbA_{1c} estable respecto a un

área de picos total de componentes de hemoglobina exclusivos de hemoglobinas anormales.

Cuando se desea el examen simultáneo de anemia mediterránea, se establece una condición de elución que permite la separación de HbA₂ de HbA₀. En este caso, la relación en nivel de HbF y HbA₂ respecto a todas las hemoglobinas se calcula para proporcionar un resultado de medición.

5 En la separación normal de hemoglobinas por medio de LC de intercambio catiónico, los componentes de hemoglobina incluidos en el pico de HbA₀ (en lo sucesivo abreviados como componentes de HbA₀) se clasifican en los dos casos siguientes, dependiendo de las condiciones de medición usadas. En la condición de medición donde una muestra de sangre que contiene HbA₂, hemoglobinas anormales o similares que tienen a quedar retenidos más fuertemente por materiales de relleno que la HbA, se somete a una elución de una sola etapa, un pico resultante incluye no solamente HbA sino también esos componentes de hemoglobina. Por otro lado, en la condición de medición que efectúa la separación de HbA₂, hemoglobinas anormales y similares, resulta un pico principalmente de HbA.

Una LC típica usada en la determinación de Hb es LC de intercambio catiónico (por ejemplo, publicación de patente japonesa N.º Hei 8-7198).

15 Los ejemplos de materiales de relleno que se sabe que son útiles para la determinación de hemoglobinas incluyen aquellos preparados mediante una reacción de partículas poliméricas inorgánicas u orgánicas con un compuesto que tiene un grupo de intercambio iónico, y aquellos preparados mediante polimerización de un monómero que tiene un grupo de intercambio iónico con un monómero reticulante.

20 Uno de factores importantes que determinan rendimientos de dichos materiales de relleno de intercambio iónico es la capacidad de intercambio iónico. Materiales de relleno de intercambio iónico convencionales tienen capacidades de intercambio iónico en el intervalo aproximado de varios meq - varias decenas de meq/g, 0,2 - 0,3 meq/g como mínimo. La capacidad de intercambio iónico depende no solamente de la cantidad del compuesto que contiene un grupo de intercambio iónico que se hará reaccionar y la condición en la que se le hace reaccionar, pero también del tamaño de partícula, el área superficial específica, el tamaño de poro, el volumen de poro y similares del material de relleno usado. Se considera, por lo tanto, muy importante conseguir optimización simultánea de la capacidad de intercambio iónico, el tamaño de poro, el área superficial específica, el volumen de poro y similares en aras de una separación precisa.

30 La patente japonesa abierta a inspección pública N.º Hei 7-27754 desvela hacer reaccionar partículas porosas que tienen diámetros de poro en el intervalo de 20 - 2.000 angstroms y áreas superficiales específicas de 0,1 - 100 m²/g con compuestos que contienen un grupo de intercambio iónico para obtener de este modo materiales de relleno que tienen capacidades de intercambio iónico en el intervalo de 0,5 - 3,0 meq/g.

35 Los materiales de relleno descritos en esta referencia se obtienen haciendo reaccionar partículas poliméricas y similares con compuestos que contienen un grupo de intercambio iónico. Por consiguiente, ha resultado difícil introducir una cantidad controlada de compuestos que contienen un grupo de intercambio iónico en las partículas poliméricas y similares. Por lo tanto, el problema de mala reproducibilidad sigue existiendo (Yoshimawari, Hosoya, Kimata y Tanaka; Chromatography, vol. 16(1), págs. 7-12 (1995)).

40 Además, en el caso en el que las partículas poliméricas son partículas de sílice, surgen los siguientes problemas: un intervalo de pH de un eluyente es limitado; la resolución se reduce mediante adsorción inespecífica; y las vidas útiles de las columnas se acortan. En el caso de partículas poliméricas naturales que muestran la tendencia incrementada de hincharse y contraerse, surge un problema de baja resistencia a la presión.

45 Por otro lado, los materiales de relleno preparados mediante polimerización de un monómero que contiene un grupo de intercambio iónico con un monómero reticulante parecen ser favorecidos respecto a los materiales de relleno descritos anteriormente, dado que su uso incrementa la reproducibilidad, facilita la fabricación y prolonga las vidas útiles de las columnas. Sin embargo, aún no se han descrito materiales de relleno que resulten de la polimerización de un monómero que contiene un grupo de intercambio iónico con un monómero reticulante y que tengan tamaño de poro, área superficial específica, volumen de poro, capacidad de intercambio iónico y similares optimizados.

50 Una cromatografía de líquidos de alta resolución (en lo sucesivo abreviada como HPLC) especialmente diseñada para usar columnas rellenas con los materiales convencionales descritos anteriormente han llegado a ser usadas ampliamente como un "dispositivo de medición automática de glucohemoglobina" en el campo de los ensayos clínicos.

Dichos dispositivos generalmente utilizan intercambio catiónico como mecanismo de separación, y separan hemoglobinas basándose en la diferencia en el grado de interacción entre cargas positivas en ellos y cargas negativas en los grupos funcionales introducidos en los materiales de relleno.

55 Un eluyente especial para uso en dicho dispositivo se prepara generalmente añadiendo cloruro sódico o similares, como agente de ajuste de la fuerza iónica, a un fosfato u otro tampón que muestra una acción tamponante en una condición más ácida que un punto isoeléctrico de modo que cada componente de hemoglobina se vuelva cargado

positivamente.

Generalmente, se usa una única bomba de suministro de líquido para suministrar 2 o 3 tipos de eluyentes que tienen diferentes poderes de elución de acuerdo con una técnica de elución de gradiente escalonado. El control del pH y la fuerza iónica crea dicha diferencia del poder de elución entre los eluyentes.

5 Donde se usan dos tipos de eluyentes, un primer eluyente que tiene un poder de elución más débil se suministra en primer lugar para eluir de HbA_{1a} a HbA_{1c} y posteriormente se cambia a un segundo eluyente que tiene un poder de elución más fuerte para la elución de HbA₀. Donde se usan tres tipos de eluyentes, un primer eluyente que tiene el poder de elución más débil se usa inicialmente para eluir de HbA_{1a} a las inmediaciones de HbF, cambiado posteriormente a un segundo eluyente que tiene un poder de elución más fuerte para eluir desde ésta hasta HbA_{1c}, y finalmente se cambia a un tercer eluyente que tiene el poder de elución más fuerte para eluir los componentes de hemoglobina restantes, es decir, HbA₀ y siguientes. El uso de tres eluyentes diferentes complica el dispositivo, pero proporciona un pico de HbA_{1c} más nítido y permite el acortamiento de un tiempo de medición.

15 Antes de que una muestra se vierta en una HPLC, la sangre debe pretratarse con un reactivo hemolizante (líquido que diluye hemolíticamente) que deseablemente diluye hemolíticamente la sangre a una concentración de hemoglobina adecuada sin efecto adverso sobre la separación. Un reactivo típico se prepara, de este modo, añadiendo un agente hemolizante, tal como un agente tensioactivo no iónico, a un tampón líquido que incorpora el mismo agente tamponante que el contenido en el eluyente.

20 Dicho dispositivo generalmente incluye un filtro de línea aguas arriba de una columna para impedir que los "fragmentos" de medio de sellado de la bomba de suministro de líquido o sustancias extrañas presentes en la muestra entre en las columnas. Durante la medición, el filtro de línea muestra una creciente pérdida de presión con acumulación de sustancias extrañas, que está asociada con la resistencia a la presión o similar del dispositivo. Esto necesita sustitución del filtro de línea. Dado que una operación de sustitución del filtro de línea requiere una hora de trabajo, se demanda una medida para prolongar una vida útil del filtro de línea para mejorar las características de manipulación del dispositivo.

25 Otro filtro (en lo sucesivo denominado como un filtro de columna) se proporciona dentro de un accesorio terminal dispuesto en cada extremo de una columna para alojar materiales de relleno dentro de la columna mientras se permite el flujo del eluyente y la muestra a través de la columna.

30 Generalmente se requiere de estos filtros de línea y de columna que su tipo y configuración de material no afecte de forma adversa a la separación de componentes a determinar. Normalmente, están construidos de acero inoxidable y tienen una configuración cilíndrica.

El documento US-A-5.348.649 se refiere a un aparato para medir glucohemoglobinas.

El documento US-A-4.727.036 describe que una solución acuosa que comprende un ion caotrópico, guanidina, se usa para desnaturalizar una proteína, de modo que el epítipo para la proteína se exponga para unirse a un anticuerpo.

35 El documento XP008130112 describe la extracción de antígeno de inmunodifusión de anemia infecciosa equina con ayuda de iones caotrópicos.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para determinar hemoglobinas que pueda superar las deficiencias anteriores encontradas en las técnicas anteriores, que proporcione una resolución satisfactoria en el plazo de un corto periodo de tiempo y que permita la determinación de HbA_{1c} estable con alta precisión.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un material de relleno para LC de intercambio catiónico que pueda superar las deficiencias anteriores encontradas en los materiales de relleno anteriores para LC de intercambio catiónico, que muestre durabilidad y reproducibilidad satisfactorias, y que permita una elevada resolución en el plazo de un corto periodo de tiempo.

45 De acuerdo con la invención de la presente solicitud, se proporciona un método para determinar hemoglobinas mediante LC de intercambio catiónico que emplea de forma característica un eluyente que contiene perclorato como ion caotrópico y también contiene un ácido inorgánico, un ácido orgánico y/o cualquier sal del mismo que tenga capacidad tamponante en el intervalo de pH de 4,0 - 6,8.

50 En un aspecto particular de la presente invención, se emplea un eluyente que, cuando entra en una columna, tiene un pH igual a o desplazado a un lado alcalino respecto a un punto isoeléctrico de hemoglobina, de modo que la HbA₀ pueda eluirse.

En un aspecto más particular de la presente invención, el eluyente tiene un pH de 6,8 o superior.

En un aspecto particular adicional de la presente invención, se usan al menos 3 tipos de eluyentes que tienen diferentes poderes de elución. Antes de que se suministre un tipo de eluyente destinado a eluir HbA₀, se suministran los otros tipos de eluyentes.

5 En un aspecto particular de la presente invención, se suministra un eluyente de acuerdo con una técnica de elución de gradiente lineal o gradiente escalonado y su poder de elución se reduce en el transcurso del suministro.

En un aspecto particular adicional de la presente invención, posterior a la elución de HbA₀, se eluye al menos un tipo de hemoglobina del grupo que consiste en HbA₂, HbS y HbC.

En un aspecto particular adicional de la presente invención, el eluyente mencionado anteriormente contiene uno o más tipos de aminas que tienen un peso molecular de 20 - 500.

10 En un aspecto particular adicional de la presente invención, se usa un reactivo hemolizante que contiene uno o más tipos de aminas que tienen un peso molecular de 20 - 500.

15 El material de relleno para LC, tal como se describe en el presente documento, es el material de relleno para LC para cromatografía de intercambio catiónico aplicable al método de determinación de hemoglobinas de acuerdo con la presente invención, y se caracteriza por lo siguiente: está compuesto por un polímero formado a partir de un monómero que tiene un grupo de intercambio iónico y un monómero reticulante; tiene poros que tienen un diámetro promedio de 10 - 100 angstroms; y tiene un área superficial específica de 0,05 - 5 m² por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno, un volumen de poro de 0,1 - 10 μl por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno y una capacidad de intercambio iónico de 1 - 100 μeq por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno.

20 Un filtro tal como se describe en el presente documento se caracteriza por estar compuesto por poliéster cetona y/o polietileno.

Un reactivo hemolizante, tal como se describe en el presente documento, se caracteriza por contener un ion caotrópico.

La presente invención se explica en detalle a continuación.

25 El eluyente usado en la invención de la presente solicitud contiene perclorato como ion caotrópico, y también contiene un ácido inorgánico, un ácido orgánico o cualquier sal de los mismos que tiene una capacidad tamponante en el intervalo de pH de 4,0 - 6,8.

El ion caotrópico es un ion que se produce mediante disociación de compuestos cuando se disuelven en una solución acuosa, destruye una estructura de agua y suprime la reducción de entropía del agua que se produce en el momento del contacto con un material hidrófobo.

30 El ion caotrópico negativo es un ion perclorato. Los ejemplos de iones caotrópicos positivos incluyen un ion bario, ion calcio, ion litio, ion cesio, ion potasio, ion magnesio, ion guanidina y similares.

Los iones caotrópicos preferidos que pueden usarse en la invención, entre los iones enumerados anteriormente, incluyen iones negativos, en los que el ion negativo es un ion perclorato; e iones positivos tales como un ion bario, ion calcio, ion magnesio, ion litio, ion cesio e ion guanidina. Son más preferidos un ion perclorato e ion guanidina.

35 Si una concentración del ion caotrópico presente en el eluyente está por debajo de 0,1 mM, un efecto de separación puede reducirse en la determinación de hemoglobinas. Por otro lado, si supera 3.000 mM, el efecto de separar hemoglobinas no muestra ninguna mejora adicional. Por lo tanto, el ion caotrópico se incorpora en el eluyente en una concentración preferentemente de 0,1 mM - 3.000 mM, más preferentemente de 1 mM - 1.000 mM, de la forma más preferente de 10 mM - 500 mM.

40 Además, los iones caotrópicos enumerados anteriormente pueden usarse en combinación.

El ion caotrópico puede incorporarse en un líquido que se pondrá en contacto con una muestra sujeta a determinación, tal como un reactivo hemolizante, líquido de dilución de muestras o similar.

45 En la invención, una sustancia que tiene una capacidad tamponante, es decir, un ácido inorgánico, ácido orgánico o cualquier sal de los mismos, se incorpora en el eluyente. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido carbónico, ácido fosfórico y similares. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácido carboxílico, ácido dicarboxílico, derivados de ácido carboxílico, ácido hidroxicarboxílico, aminoácido, ácido cacodílico, ácido pirofosfórico y similares.

50 Los ejemplos de ácidos carboxílicos incluyen ácido acético, ácido propiónico y similares. Los ejemplos de ácidos dicarboxílicos incluyen ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido ftálico y similares. Los ejemplos de derivados de ácido carboxílico incluyen ácido β,β-dimetilglutárico, ácido barbitúrico, ácido aminobutírico y similares. Los ejemplos de ácidos hidroxicarboxílicos incluyen ácido cítrico, ácido

tartárico, ácido láctico y similares. Los ejemplos de aminoácidos incluyen ácido aspártico, asparagina y similares.

Las sales de ácidos inorgánicos y orgánicos se conocen en la técnica e incluyen sales de sodio y sales de potasio, por ejemplo.

5 Los ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y sales de los mismos mencionados anteriormente pueden usarse en cualquier combinación. Además, los ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos enumerados anteriormente pueden usarse en combinación.

Donde los ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y/o sales de los mismos enumerados anteriormente se usan en combinación, una concentración total de la combinación se ajusta a un nivel suficiente para tamponar el eluyente a un pH de 4,0 - 6,8, preferentemente a 1 - 1.000 mM, más preferentemente a 10 - 500 mM.

10 En la invención, el pH del eluyente se mantiene dentro del intervalo de 4,0 - 6,8, preferentemente dentro del intervalo de 4,5 - 5,8. Si el pH del eluyente cae por debajo de 4, se puede provocar que se produzca la desnaturalización de hemoglobinas. Por otro lado, si el pH del eluyente supera 6,8, las hemoglobinas pueden estar cargadas menos positivamente para ser menos retenidas por el grupo de intercambio catiónico. Esto da como resultado mala separación de hemoglobinas.

15 Las siguientes sustancias pueden estar incorporadas en el eluyente.

(1) pueden añadirse sales inorgánicas (cloruro sódico, cloruro potásico, sulfato sódico, sulfato potásico, fosfato sódico y similares). Aunque no limitantes, estas sales pueden añadirse preferentemente en concentraciones de 1 - 1.500 mM.

20 (2) Pueden añadirse ácidos o bases conocidas como reguladores del pH. Los ejemplos de dichos ácidos incluyen ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico y similares. Los ejemplos de dichas bases incluyen hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de litio, hidróxido de magnesio, hidróxido de bario, hidróxido de calcio y similares. Aunque no limitantes, estos ácidos o bases pueden añadirse preferentemente en concentraciones de 0,001 - 500 mM.

25 (3) Disolventes orgánicos solubles en agua, tales como metanol, etanol, acetonitrilo y acetona, pueden mezclarse. Aunque no limitantes, estos disolventes orgánicos pueden añadirse preferentemente en concentraciones del 0 - 80% (v/v). Preferentemente, pueden usarse en niveles de concentración que no causan depósito del ion caotrópico, ácido inorgánico, ácido orgánico y cualquier sal de los mismos incorporado.

(4) Pueden añadirse conservantes, tales como azida sódica y timol.

30 (5) Como sustancias para estabilizar hemoglobinas, pueden añadirse estabilizantes conocidos que incluyen agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y agentes reductores/antioxidantes tales como glutatión y azida sódica.

35 Los ejemplos de agentes tamponantes incluyen sustancias inorgánicas tales como ácido fosfórico, ácido bórico, ácido carbónico y similares; y sustancias orgánicas tales como ácidos carboxílicos, ácidos dicarboxílicos, derivados de ácido carboxílico, ácidos hidroxycarboxílicos, anilina o derivados de anilina, aminoácidos, aminas, imidazoles, alcoholes y similares. Otras sustancias orgánicas útiles incluyen, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético, ácido pirofosfórico, piridina, ácido cacodílico, fosfato de glicerol, 2,4,6-colidina, N-etilmorfolina, morfolina, 4-aminopiridina, amoniaco, efedrina, hidroxiprolina, peridina, tris(hidroximetil)aminometano y glicilglicina.

Los ejemplos de ácidos carboxílicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido benzoico y similares.

40 Los ejemplos de ácidos dicarboxílicos incluyen ácido malónico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido ftálico y similares.

Los ejemplos de derivados de ácido carboxílico incluyen ácido β,β -dimetilglutárico, ácido barbitúrico, ácido 5,5-dietilbarbitúrico, ácido γ -aminobutírico, ácido pirúvico, ácido furancarboxílico, ácido ϵ -aminocaproico y similares.

Los ejemplos de ácidos hidroxycarboxílicos incluyen ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico y similares.

45 Los ejemplos de anilina o derivados de anilina incluyen anilina, dimetilánilina y similares.

Los ejemplos de aminoácidos incluyen ácido aspártico, asparagina, glicina, α -alanina, β -alanina, histidina, serina, leucina y similares. Los ejemplos de aminas incluyen etilendiamina, etanolamina, trimetilamina, dietanolamina y similares. Los ejemplos de imidazoles incluyen imidazol, 5(4)-hidroxiimidazol, 5(4)-metilimidazol, 2,5(4)-dimetilimidazol y similares.

50 Los ejemplos de alcoholes incluyen 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-etil-1,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-1-propanol y similares.

5 Los ejemplos de agentes tamponantes incluyen ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), bis(2-hidroxi-
 10 etil)iminotris(hidroximetil)metano (Bistris), ácido N-(2-acetamido)iminodiacético (ADA), ácido piperazin-N,N'-
 bis(2-etanosulfónico) (PIPES), 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (Bistrispropano), ácido N-(2-acetamida)-2-
 aminoetanosulfónico (ACES), ácido 3-(N-morfolin)propanosulfónico (MOPS), ácido N,N'-bis(2-hidroxi-
 etil)-2-aminoetanosulfónico (BES), ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-aminoetanosulfónico (TES), ácido N-2-
 hidroxi-
 etilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), ácido N-2-hidroxi-
 etilpiperazin-N'-2-propanosulfónico (HEPPS), N-
 tris(hidroximetil)metilglicina (Tricina), tris(hidroximetil)aminoetano (Tris), N,N'-bis(2-hidroxi-
 etil)glicina (Bicina), glicilglicina, ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), glicina, ácido
 ciclohexilaminopropanosulfónico (CAPS) y similares, que generalmente constituyen un tampón de Good. Los valores
 de pKa de estas sustancias se muestran en las tablas 1 y 2 (referencia citada: Takeichi HORIO y Nihei YAMASHITA,
 Fundamental Experimental Procedures of Proteins and Enzymes, Nanko-do (1985)).

[TABLA 1]

Tampón	x	pKax	°C	Tampón	x	pKax	°C
Ácido oxálico	1	1,27	25	Ácido tartárico	1	3,04	25
	2	4,27			2	4,37	
Ácido etilendiaminotetraacético	1	1,7	20	Ácido cítrico	1	3,13	25
	2	2,6			2	4,76	
	3	6,3			3	6,40	
	4	10,6		Ácido furancarboxílico	1	3,17	25
Ácido maleico	1	1,92	20	β-Alanina	1	3,55	25
	2	6,23			2	10,24	
Ácido aspártico	1	1,99	25	Ácido β,β-dimetilglutárico	1	3,71	25
	2	3,90			2	6,34	
	3	10,00		Ácido fórmico	1	3,75	25
Ácido fosfórico	1	2,15	25	Ácido láctico	1	3,88	25

[TABLA 1] (continuación)

Tampón	x	pKax	°C	Tampón	x	pKax	°C
	2	7,20		Ácido γ-aminobutírico	1	4,03	25
	3	12,38			2	10,66	
Asparagina	1	2,1	26	Ácido barbitúrico	1	4,04	26
	2	8,8		Ácido benzoico	1	4,20	25
Glicina	1	3,52	20	Ácido succínico	1	4,21	25
	2	9,91			2	5,64	
Ácido pirúvico	1	2,60	25	Ácido ε-Aminocaproico	1	4,38	20
Ácido fosfórico	2	2,0	25		2	10,98	
	4	8,95		Ácido acético	1	4,76	25

ES 2 563 162 T3

Ácido malónico	1	2,85	25	Ácido propiónico	1	4,87	26
	2	6,70		Ácido málico	1	5,26	25
Ácido ftálico	1	2,95	25	Piridina	1	5,17	25
	2	5,41		Histidina	2	6,04	25
Ácido fumárico	1	3,10	25	Ácido cacodílico	1	6,27	25
	2	4,38		5(4)-Hidroximidazol	1	6,39	25

[TABLA 2]

Tampón	x	pKax	°C	Tampón	x	pKax	°C
Ácido carbónico	1	3,76	27	Alcohol n-propílico	1	10,67	26
	2	10,33	26	Metilamina	1	10,64	26
Fosfato de glicerol	2	6,65	25	Etilamina	1	10,63	25
Etilendiamina	1	6,65	25	n-Butilamina	1	10,64	25
	2	9,91		Trietilamina	1	10,72	25
Imidazol	1	6,95	25	Dimetilamina	1	10,77	25
Ácido arsénico	2	6,77	25	Hexametildiamina	2	10,93	25
2,4,6-Colidina	1	7,43	25	Piperidina	1	11,12	25
5(4)-Metilimidazol	1	7,52	25	MES	1	8,16	20
N-Etilmorfolina	1	7,67	26	Bistris	1	6,5	20
Ácido dietilbarbitúrico 5,5-	1	7,98	25	ADA	1	6,6	20
2,5(4)-Dimetilimidazol	1	8,36	25	PIPES	1	6,8	20
Morfolina	1	8,60	26	Bistrispropano	1	6,8	20
2-Amino-2-metil-1,3-propanodiol	1	8,79	26		2	9,0	
2-Amino-2-etil-1,3-propanodiol	1	8,80	26	ACES	1	6,9	20
Dietanolamina	1	8,88	25	MOPS	1	7,16	20
4-Aminopiridina	1	9,11	25	BES	1	7,15	20
Serina	2	9,21	25	TES	1	7,5	20

[TABLA 2] (continuación)

Tampón	x	pKax	°C	tampón	x	pKax	°C
Ácido bórico	1	9,24	25	HEPES	1	7,55	20
Amoniaco	1	9,25	25	HEPPS	1	8,1	20

Etanolamina	1	9,60	25	Tricina	1	8,15	20
Efedrina	1	9,39	25	Tris	1	8,3	20
Hidroxiprolina	2	9,66	25	Bicina	1	8,35	20
2-Amino-2-metil-1-propanol	1	9,69	25	Glicilglicina	1	8,4	20
Leucina	2	9,74	26	TAPS	1	8,55	20
Trimetilamina	1	9,80	25	Glicina	1	9,9	20
α -Alanina	1	9,87	25	CAPS	1	10,4	20

5 La concentración del agente tamponante en el eluyente no está particularmente especificada, siempre que su acción como tampón sea eficaz. Está preferentemente en el intervalo de 1 - 1.000 mM, más preferentemente en el intervalo de 10 - 500 mM. Los agentes tamponantes mencionados anteriormente pueden usarse en solitario o en combinación. Por ejemplo, pueden usarse agentes tamponantes orgánicos e inorgánicos en combinación.

10 En la presente invención, al menos dos tipos de eluyentes que tienen diferentes valores de pH pueden usarse preferentemente. En tal caso, los eluyentes usados para separar picos diana preferentemente contienen el mismo tipo de agente tamponante. Sin embargo, esto no es necesario a menos que las mediciones resulten afectadas de forma adversa por una variación inicial (o salida del detector) que puede producirse cuando los eluyentes se cambian de uno a otro.

Preferentemente, los eluyentes usados para separar picos diana contienen la misma concentración de agente tamponante. Esto es eficaz para reducir adicionalmente la variación inicial.

Los pH de los eluyentes pueden controlarse mediante la cantidad del regulador del pH que se les añadirá.

15 Al menos dos tipos de eluyentes que tienen pH diferentes pueden suministrarse de acuerdo con un gradiente o técnica de elución en gradiente escalonado.

Los picos diana, tal como se ha descrito anteriormente, incluyen HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c} lábil, HbA_{1c} estable, AHb, CHb, HbA₀, HbA₂, HbS, HbC y similares.

20 El pH del eluyente usado para separar componentes de hemoglobina a eluir antes que HbA₀ se mantiene preferentemente en el intervalo de 4,0 - 6,8, más preferentemente en el intervalo de 4,5 - 5,8. Si el pH cae por debajo de 4,0, se puede provocar que se produzca la modificación de las hemoglobinas. Si el pH supera 6,8, las hemoglobinas pueden cargarse de forma menos positiva para ser menos retenidas por el grupo de intercambio iónico. Esto da como resultado una mala resolución.

25 En la presente invención, para eluir HbA₀, es decir, "componentes de HbA₀" que consisten en HbA y otros que son retenidos con más fuerza por el material de relleno que HbA_{1c}, el eluyente se ajusta preferentemente de modo que, cuando entra en una columna, tenga un pH igual a o desplazado hacia un lado alcalino respecto a un punto isoeléctrico de hemoglobina. Dicha condición puede alcanzarse mediante diversas técnicas, tales como el suministro de un eluyente que tiene un pH desplazado a un lado alcalino respecto a un punto isoeléctrico de hemoglobina, y el uso de al menos dos eluyentes que tienen pH diferentes.

30 Cuando el pH del eluyente se desplaza desde un lado ácido hasta un lado alcalino respecto a un punto isoeléctrico de hemoglobina, una carga total de la hemoglobina se cambia de positiva a negativa. Esto da como resultado la "elución de los componentes de HbA₀ mediante la acción de una fuerza repulsiva eléctrica" con respecto al grupo de intercambio iónico incorporado en el material de relleno.

35 El punto isoeléctrico de la hemoglobina existe en el intervalo de pH de 6,8 - 7,0, tal como se describe en la Encyclopedia of Physics and Chemistry (página 1178, 4ª ed., Iwanami Shoten, septiembre de 1987, editada por Ryogo Kubo et al.). Por consiguiente, es más preferido que el eluyente, cuando entra en una columna, tenga un pH de 6,8 o superior, con el fin de eluir componentes de HbA₀.

40 Si debe cumplirse dicha condición, al menos uno de los eluyentes usados debe tener un pH de 6,8 o superior. Dicho eluyente tiene, preferentemente, un pH de 7,0 - 12,0, más preferentemente de 7,5 - 11,0, de la forma más preferente de 8,0 - 9,5. Si el pH de este eluyente está por debajo de 6,8, puede producirse elución insuficiente de componentes de HbA₀. El pH del eluyente se ajusta, preferentemente, dentro del intervalo que no causa descomposición del material de relleno usado.

Los ejemplos de eluyentes adecuados para elución de componentes de HbA₀, es decir, que tienen capacidades tamponantes a un pH de 6,8 o superior, incluyen tampones compuestos por ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y sales de los mismos. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácido fosfórico, ácido bórico, ácido carbónico y similares. Los ejemplos de ácidos orgánicos incluyen ácidos hidroxicarboxílicos tales como ácido cítrico, derivados de ácido carboxílico tales como ácido β,β-dimetilglutárico, ácidos dicarboxílicos tales como ácido maleico, ácido cacodílico y similares. También son útiles los llamados tampones de Good, cuyos ejemplos incluyen ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), bis(2-hidroxietil)iminotris-(hidoxilmetil)-metano (Bistris), Tris, ADA, PIPES, Bistris propano, ACES, MOPS, BES, TES, HEPPS, Tricina, Bicina, glicilglicina, TAPS, CAPS y similares. También son útiles un tampón de Britton y Robinson y un tampón GTA. También pueden usarse orgánicos que incluyen imidazoles tales como imidazol; aminas tales como etilendiamina, metilamina, etilamina, trietilamina, dietanolamina, trietanolamina; aminoácidos tales como glicina, β-alanina, ácido aspártico, asparagina; y similares.

Los ácidos inorgánicos mencionados anteriormente; ácidos orgánicos; sales de aquellos ácidos inorgánicos y orgánicos; y orgánicos pueden usarse en combinación. Como alternativa, los ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos y orgánicos mencionados anteriormente pueden usarse en combinación.

Preferentemente, un ion caotrópico se incorpora en el eluyente para conseguir una elución más eficaz de los componentes de HbA₀. El tipo y otros detalles del ion caotrópico son similares al caso de la primera invención.

El ion caotrópico se añade a la concentración de 1 - 3.000 mM, preferentemente de 10 - 1.000 mM, más preferentemente de 50 - 500 mM.

En un aspecto particular de la presente invención, se usan tres tipos de eluyentes que tienen diferentes poderes de elución. Antes de que se suministre un tipo de eluyente destinado a eluir HbA₀, se suministran los otros tipos de eluyentes.

Es decir, cuando el eluyente destinado a eluir componentes de HbA₀ se hace pasar a través de una columna (mediante una bomba de suministro), los componentes de HbA₀ se eluyen. Antes de que este eluyente se suministre, se suministran los otros tipos de eluyentes de modo que los otros componentes de hemoglobina se eluyan antes que los componentes de HbA₀.

Picos diana tales como HbA_{1c} estable pueden eluirse más nítidamente si se usan al menos dos eluyentes que tienen un pH de 4,0 - 6,8 para eluir los otros componentes de hemoglobina antes que los componentes de HbA₀ de acuerdo con una técnica de gradiente de concentración de sal, una técnica de gradiente de pH o una combinación de las mismas.

En un aspecto particular de la presente invención, se usan al menos dos eluyentes para eluir hemoglobinas (HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c} lábil, HbA_{1c} estable) antes que HbA₀ y un eluyente que tiene el poder de elución más débil se suministra el primero de todos.

En el método para determinar hemoglobinas de acuerdo con la presente invención, un eluyente puede suministrarse preferentemente de acuerdo con una técnica de elución de gradiente lineal o gradiente escalonado con su poder de elución reduciéndose a lo largo de la trayectoria de suministro.

Los métodos de LC convencionales utilizan una técnica de elución de gradiente lineal o gradiente escalonado usando múltiples eluyentes, con lo que los picos de componentes sometidos a separación se hacen nítidos y la resolución de dos o más picos de elución contiguos mejora.

La llamada "técnica de elución de gradiente lineal" emplea múltiples bombas de suministro mediante las cuales las relaciones de suministro de múltiples eluyentes que tienen diferentes poderes de elución cambian continuamente. Como resultado, la elución continúa, de modo que un poder de elución global se incrementa de forma continua con el tiempo, tal como se muestra en la figura 32.

La llamada "técnica de elución de gradiente escalonado" emplea una bomba de suministro conectada de forma comunicativa a múltiples eluyentes como mediante una válvula solenoide. La secuencia de suministro se modifica a partir del eluyente que tiene un poder de elución menor al eluyente que tiene un poder de elución mayor cambiando una posición de la válvula solenoide. Como resultado, el poder de elución muestra un incremento escalonado tal como se muestra en la figura 33.

Sin embargo, en el caso en el que componentes a eluir son de naturaleza similar entre sí o donde la elución debe realizarse en el plazo de un corto periodo de tiempo, el gradiente convencional o técnica de elución de gradiente escalonado conlleva una posibilidad de que picos de componentes similares se solapen entre sí para dar como resultado la resolución reducida.

En contraste, en el aspecto particular de la presente invención descrito anteriormente, aunque la serie de eluyentes se suministran de acuerdo con el gradiente o proceso de elución escalonado, su secuencia de suministro está controlada de modo que el poder de elución se reduzca temporalmente a lo largo de una trayectoria de suministro,

considerando picos sometidos a separación o temporización de la elución entre los picos, para hacer más nítida y mejorar la resolución de los picos. Específicamente, donde se utiliza el proceso de elución escalonado, los eluyentes son suministrados secuencialmente de la siguiente forma; el eluyente que tiene un poder de elución menor se suministra inicialmente, se cambia al eluyente que tiene un poder de elución mayor, a continuación al eluyente que

5

tiene un poder de elución menor, y después de un rato, finalmente al eluyente que tiene un poder de elución mayor.

En la LC de intercambio catiónico, el poder de elución el eluyente puede reducirse, por ejemplo, mediante una técnica mediante la cual una concentración de sal del eluyente se rebaja, una técnica mediante la cual un pH del eluyente se rebaja, o una combinación de las mismas.

10

En la LC de intercambio aniónico, puede utilizarse una técnica que rebaja una concentración de sal del eluyente o incrementa un pH del eluyente. En la cromatografía de fase inversa, puede utilizarse una técnica mediante la cual la polaridad de un disolvente orgánico se eleva. En la cromatografía en fase normal, puede utilizarse una técnica mediante la cual la polaridad de un disolvente orgánico se rebaja.

15

Lo siguiente ilustra más específicamente el caso en el que hemoglobinas se separan de acuerdo con una técnica mediante la cual el poder de elución del eluyente se rebaja mientras está siendo suministrado de acuerdo con un gradiente o proceso de elución escalonado.

20

Para la separación de hemoglobinas, se usa una columna rellena con materiales de intercambio catiónico. Un eluyente que tiene una concentración de sal de 20 - 1.000 mM y un pH en el intervalo de 4 - 9 se suministra de acuerdo con un gradiente o proceso de elución escalonado. El eluyente mientras es suministrado se reduce a una concentración de sal de 5 - 500 mM y un pH en el intervalo de 0,1 - 3, de modo que su poder de elución se rebaja a lo largo de una trayectoria de suministro.

25

La figura 16 muestra un equipo ejemplar mediante el cual el método de la presente invención puede ponerse en práctica de acuerdo con el proceso de elución escalonado. Los eluyentes A, B, C y D tienen diferentes poderes de elución (por ejemplo, difiriendo entre sí en concentración de sal, pH, polaridad o similares). Una válvula solenoide 1 controla un suministro selectivo de dichos eluyentes a intervalos de tiempo especificados. El eluyente seleccionado, junto con una muestra introducida a partir de un inyector de muestras 3, se suministran a la columna 4 mediante una bomba de suministro 2. Los componentes de hemoglobina presentes en la muestra son detectados por un detector 5. Un integrador 6 calcula un área, altura y otros valores características de cada pico.

30

En el caso en el que se analiza una muestra de sangre que contiene componentes de hemoglobina, tales como HbA₂, HbS y HbC, que podrían afectar de forma adversa la determinación de HbA_{1c} estable, puede hacerse que un procedimiento mediante el cual HbA se eluye principalmente como componente de HbA₀ representativo (pico) preceda a un procedimiento mediante el cual se eluyen HbA₂, HbS, HbC y similares. Esto permite la separación de componentes de hemoglobina diferentes de HbA del pico de HbA₀, causando un cálculo más preciso de HbA_{1c} estable (%).

35

En el caso en el que el procedimiento de eluir HbA₂, HbS, HbC y similares está establecido, el "eluyente destinado a eluir HbA₀", tal como se usa en el método descrito anteriormente donde se usan al menos tres tipos de eluyentes que tienen diferentes poderes de elución, significa un eluyente destinado a eluir un pico de HbA₀ que consiste principalmente en HbA. Se requiere, entonces, suministrar un eluyente que tiene un poder de elución más fuerte para eluir HbA₂, HbS, HbC y similares después de que el "eluyente destinado a eluir HbA₀" ha sido suministrado.

40

En el presente método para determinar hemoglobinas mediante LC de intercambio catiónico, en el caso en el que las hemoglobinas pueden afectar a las mediciones mediante su adsorción a un pasaje de flujo, al menos un tipo de amina que tiene un peso molecular de 20 - 500 se incorpora preferentemente en el eluyente o reactivo hemolizante de acuerdo con la presente invención.

45

Los ejemplos de dichas aminas incluyen aminas primarias, secundarias y terciarias que tienen pesos moleculares de 20 - 500. Los ejemplos de aminas primarias incluyen metilamina, etilamina, 2-aminoetanol y similares. Los ejemplos de aminas secundarias incluyen dimetilamina, dietilamina, etilmetilamina y similares. Los ejemplos de aminas terciarias incluyen trimetilamina, trietilamina, dimetiletilamina y similares.

50

La amina, si su peso molecular cae por debajo de 20, se vuelve muy volátil para presentar un problema de almacenamiento. La amina se vuelve menos soluble si su peso molecular supera 500. Por consiguiente, el peso molecular de la amina se mantiene dentro del intervalo de 20 - 500, preferentemente 25 - 400, más preferentemente 30 - 150.

55

Si la concentración de la amina incorporada en el eluyente o reactivo hemolizante está por debajo de 1 ppm, es probable que se produzca la adsorción inespecífica de hemoglobinas dentro de una trayectoria de flujo. Si ésta supera 5.000 ppm, se produce una mala resolución de hemoglobinas. Por consiguiente, la concentración de amina se mantiene, preferentemente, en el intervalo de 1 - 5.000 ppm, más preferentemente 5 - 1.000 ppm, de la forma más preferente 10 - 500 ppm.

El material de relleno, tal como se describe en el presente documento, es el material de relleno para LC de

intercambio catiónico, que comprende un material polimérico derivado de un monómero que tiene un grupo de intercambio catiónico y un monómero reticulante. El material de relleno tiene poros que tienen un diámetro promedio de 10 - 100 angstroms, un área superficial específica de 0,05 - 5 m² por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno, un volumen de poro de 0,1 - 10 µl por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno y una capacidad de intercambio iónico de 1 - 100 µeq por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno.

El monómero que tiene un grupo de intercambio catiónico, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un monómero que tiene al menos un grupo de intercambio catiónico y al menos un grupo polimerizable. El grupo de intercambio iónico es un grupo funcional que muestra la capacidad de intercambiar cationes en un intervalo de pH específico y puede ilustrarse mediante grupos de intercambio catiónico conocidos, cuyos ejemplos incluyen carboxilo, sulfónico, fosfórico y similares. El tipo de grupo polimerizable no se especifica particularmente y puede ilustrarse mediante grupos polimerizables tales como grupo vinilo.

Los ejemplos de monómeros que tienen un grupo carboxilo, como grupo de intercambio catiónico ilustrativo, incluyen ácido (met)acrílico, ácido 2-(met)acrilolioxietilsuccínico, ácido crotonico, ácido itacónico, ácido citracónico, ácido mesacónico, ácido maleico, ácido fumárico, derivados de los mismos y similares.

Los ejemplos de monómeros que tienen un grupo fosfórico, como grupo de intercambio catiónico ilustrativo, incluyen ((met)acrilolioxietil)ácido fosfato, (2-(met)acrilolioxietil)ácido fosfato, (3-(met)acrilolioxipropil)ácido fosfato, derivados de los mismos y similares.

Los ejemplos de monómeros que tiene un grupo sulfónico, como grupo de intercambio catiónico ilustrativo, incluyen ácido (met)alilsulfónico, ácido 2-(met)acrilamida-2-metilpropanosulfónico, ácido (3-sulfopropil)itacónico, ácido 3-sulfopropil(met)acrílico, derivados de los mismos y similares.

Además de los monómeros enumerados anteriormente que tienen diversos grupos de intercambio catiónico, sus derivados, sales de los mismos como con sodio o potasio, cloruros de los mismos y similares también pueden ser útiles.

El monómero que tiene un grupo de intercambio catiónico puede estar en forma de un monómero que tiene un grupo funcional que puede convertirse en un grupo de intercambio catiónico mediante una reacción química. El grupo funcional en dicho monómero puede convertirse en un grupo de intercambio catiónico mediante una reacción química después de que el monómero ha sido polimerizado. Son reacciones químicas ilustrativas hidrólisis y una reacción de transferencia. Un grupo funcional ilustrativo que puede convertirse en un grupo de intercambio catiónico mediante una reacción química es un grupo éster. Puede utilizarse el siguiente ejemplo específico. Se permite polimerizar a un monómero de metacrilato de metilo y a continuación se calienta en una condición alcalina de modo que los enlaces éster se descompongan para producir el intercambio por grupos carboxilo, dando como resultado la preparación de materiales de relleno para LC de intercambio catiónico, que comprenden un material polimérico tal como se deriva de un monómero que tiene un grupo de intercambio catiónico y un monómero reticulante.

La cantidad del monómero que tiene un grupo de intercambio catiónico puede modificarse dependiendo del tipo particular del monómero usado, pero puede estar preferentemente en el intervalo de 10 - 200 partes en peso, basándose en 100 partes en peso del monómero reticulante. Si la cantidad es menor de 10 partes en peso, su capacidad de intercambio catiónico puede volverse demasiado baja para producir una reacción de intercambio catiónico suficiente. Esto rebaja la resolución. Por otro lado, si la cantidad supera las 200 partes en peso, su hidrofiliia puede volverse mayor para reducir la resistencia a la presión y el hinchamiento de nuevo. Además, puede requerir un tiempo prolongado hasta que el eluyente sustituido llega al equilibrio. Esto prolonga de forma problemática un periodo de medición. Los mínimos enumerados anteriormente pueden usarse en combinación, cuando se necesita.

El monómero reticulante puede ejemplificarse mediante monómeros que tienen dos o más grupos vinilo por molécula, tales como derivados de éster (met)acrílico descritos a continuación, compuestos de dieno alifáticos y derivados de los mismos. Los ejemplos de monómeros que tienen dos o más grupos vinilo por molécula incluyen derivados estirénicos, tales como divinilbenceno, diviniltolueno, divinilxileno, diviniletilbenceno y divinilnaftaleno.

Los ejemplos de derivados de éster (met)acrílico incluyen di(met)acrilato de etilenglicol, di(met)acrilato de polietilenglicol, di(met)acrilato de 1,3-butilenglicol, di(met)acrilato de 1,6-hexaglicol, di(met)acrilato de neopentilglicol, di(met)acrilato de polipropilenglicol, tri(met)acrilato de trimetiloletano, tri(met)acrilato de trimetilolpropano, tri(met)acrilato de tetrametilolpropano, tri(met)acrilato de tetrametilolmetano, tetra(met)acrilato de tetrametilolmetano, 2-hidroxi-1,3-di(met)acriloxipropano, 2-hidroxi-1-acriloxi-3-metacriloxipropano, 1,10-di(met)acriloxi-4,7-dioxadecano-2,9-diol, 1,10-di(met)acriloxi-5-metil-4,7-dioxadecano-2,9-diol, 1,11-di(met)acriloxi-4,8-dioxadecano-2,6,10-triol, derivados de los mismos y similares.

Los ejemplos de compuestos de dienol alifáticos incluyen 1,3-butadieno, isopreno, 1,4-hexadieno, derivados de los mismos y similares.

El material de relleno, tal como se describe en el presente documento, puede prepararse a partir de los monómeros

mencionados anteriormente usando técnicas de polimerización conocidas tales como polimerización en suspensión, polimerización en emulsión y polimerización en dispersión. La publicación de patente japonesa N.º Hei 8-7197 describe una técnica particularmente preferida que comprende, en secuencia, preparar partículas poliméricas reticulantes a partir de un monómero reticulante, impregnar un iniciador de la polimerización en las partículas poliméricas, añadir un monómero que tiene un grupo de intercambio iónico, y polimerizar la mezcla.

El iniciador de la polimerización usado en la polimerización de monómeros no es de un tipo particularmente especificado y puede ser un iniciador de la polimerización de radicales libres soluble en agua o en aceite conocido. Los ejemplos de iniciadores de radicales libres, incluyen persulfatos tales como persulfato potásico, persulfato sódico y persulfato de amonio; peróxidos orgánicos tales como hidroperóxido de cumeno, peróxido de benzóilo, peróxido de lauroilo, peróxido de octanoilo, peróxido de o-clorobenzóilo, peróxido de acetilo, hidroperóxido de t-butilo, peroxiacetato de t-butilo, peroxiisobutilato de t-butilo, peróxido de 3,5,5-trimetilhexanoilo, t-butilperoxi-2-etilhexanoato y peróxido de dit-butilo; y compuestos azo tales como 2,2-azobisisobutironitrilo, 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo), ácido 4,4-azobis(4-cianopentanoico), 2,2-azobis(2-metilbutironitrilo), 2,2-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) y azobisciclohexanocarbonitrilo.

Preferentemente, la cantidad del iniciador de la polimerización se mantiene en el intervalo de 0,05 - 1 parte en peso, basándose en 100 partes en peso del monómero reticulante. Si la cantidad del iniciador es menor de 0,05 partes en peso, la polimerización resultante puede volverse insuficiente o requerir un periodo de tiempo prolongado. Por otro lado, si la cantidad supera 1 parte en peso, se puede hacer avanzar a la reacción rápidamente y, posiblemente, produzca agregados. El iniciador de la polimerización se usa preferentemente en una forma que está disuelta en el monómero reticulante.

Además del monómero reticulante y otros, tal como se ha descrito anteriormente, otros aditivos tales como un monómero no reticulante, un disolvente orgánico y partículas poliméricas también pueden cargarse en la preparación del polímero mencionado anteriormente. Dichos aditivos se conocen en la técnica y no están limitados a los ilustrados a continuación.

Los ejemplos de monómeros no reticulantes incluyen derivados estirénicos tales como estireno, α -metilestireno, p-metilestireno y clorometilestireno; monómeros alifáticos tales como cloruro de vinilo; ésteres vinílicos tales como acetato de vinilo, propionato de vinilo y estearato de vinilo; y derivados del ácido acrílico tales como (met)acrilato de metilo, (met)acrilato de etilo, (met)acrilato de butilo, (met)acrilato de 2-etilhexilo, (met)acrilato de estearilo, (met)acrilamida, (met)acrilonitrilo y (met)acrilato de glicidilo.

La cantidad del monómero no reticulante puede modificarse dependiendo del tipo particular del monómero usado, pero puede estar, preferentemente, en el intervalo de 0 - 100 partes en peso, basándose en 100 partes en peso del monómero reticulante. Los monómeros no reticulantes enumerados anteriormente pueden usarse en combinación, cuando sea necesario.

El tipo del disolvente orgánico puede seleccionarse entre aquellos conocidos en la técnica dependiendo de los tipos de los monómeros usados. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen hidrocarburos aromáticos tales como tolueno, xileno, dietilbenceno y dodecibenceno; hidrocarburos saturados tales como hexano, heptano, octano y decano; alcoholes tales como metanol, etanol, alcohol isopropílico, alcohol butílico, alcohol isoamílico, alcohol hexílico y alcohol octílico; aminas tales como dimetilformamida; y éteres tales como éter dietílico.

Estos disolventes orgánicos pueden añadirse en la forma de incorporar el monómero reticulante o monómero que contiene un grupo de intercambio catiónico disuelto en su interior, o añadirse por separado a un medio de dispersión. Estos pueden añadirse inicialmente o durante la polimerización preferentemente en la cantidad de 0 - 300 partes en peso, basándose en 100 partes en peso del monómero reticulante.

Las partículas poliméricas mencionadas anteriormente tienen una distribución del tamaño de partícula uniforme. Cuando se añaden al monómero reticulante o una mezcla del mismo con el monómero que contiene un grupo de intercambio iónico, la posterior polimerización permite la producción de materiales de relleno que tienen una distribución del tamaño de partícula uniforme. Los ejemplos de partículas poliméricas incluyen partículas de polímero no reticulante preparadas mediante homo- o copolimerización de los monómeros no reticulantes enumerados anteriormente, tales como un polímero de estireno, copolímero de estireno-divinilbenceno, polímero de (met)acrilato de metilo y polímero de (met)acrilato de etilo. También son útiles como partículas poliméricas partículas poliméricas reticuladas derivadas del monómero no reticulante y del monómero reticulante mencionados anteriormente. En dicho caso, partículas poliméricas no reticulantes que contienen hasta el 10% de polímero reticulante pueden usarse preferentemente.

Las partículas poliméricas pueden producirse mediante técnicas de polimerización conocidas en la técnica, por ejemplo, preparadas mediante polimerización en emulsión, sin jabón, en dispersión o en suspensión.

Preferentemente, las partículas poliméricas tienen un diámetro medio de partícula de 0,1 - 10 μm con un coeficiente de variación (valor de CV (%)) = 15% o menor (valor de CV (%) = (desviación estándar/diámetro medio de partícula) x 100).

La cantidad de partículas poliméricas puede estar, preferentemente, en el intervalo de 0,5 - 100 partes en peso, basándose en 100 partes en peso del monómero reticulante.

El material de relleno, tal como se describe en el presente documento, tiene poros con un diámetro promedio de 10 - 100 angstroms. Fuera de este intervalo, surgen los siguientes problemas. Es difícil generalmente producir materiales de relleno que tienen poros con un diámetro promedio de por debajo de 10 angstroms de manera controlada y reproducible. Los materiales de relleno que tienen poros con un diámetro promedio de más de 100 angstroms se hinchan y se contraen fácilmente para causar posiblemente variaciones de pérdida de presión durante la medición. Además, en el caso en el que se usan múltiples eluyentes, requiere un largo periodo antes de que el interior de una columna llega al equilibrio cuando se cambia el eluyente.

El área superficial específica del material de relleno, tal como se describe en el presente documento, es 0,05 - 5 m² por unidad de peso seco (1 g) del material de relleno. Fuera de este intervalo, surgen los siguientes problemas. Si el área superficial específica cae por debajo de 0,05 m²/g, el diámetro de partícula del material de relleno se vuelve grande, para dar como resultado las resoluciones reducidas. Si ésta supera 5 m²/g, el diámetro de partícula del material de relleno se vuelve muy pequeño, para dar como resultado la pérdida de presión incrementada.

El volumen de poro del material de relleno, tal como se describe en el presente documento, está en el intervalo de 0,1 - 10 µl por unidad de peso seco (1 g) de material de relleno. Fuera de este intervalo, surgen los siguientes problemas. Generalmente es difícil producir materiales de relleno que tienen un volumen de poro de por debajo de 0,1 µl/g de manera controlada y reproducible. Los materiales de relleno que tienen volúmenes de poro de más de 10 µl/g se hinchan y se contraen fácilmente para causar posiblemente variaciones en la medición de pérdida de presión. También en el caso en el que se usan múltiples eluyentes, se requiere un largo periodo antes de que el interior de una columna llegue a equilibrio cuando el eluyente se cambia.

La capacidad de intercambio iónico del material de relleno, tal como se describe en el presente documento, está en el intervalo de 1 - 100 µeq por unidad de peso seco (1 g) de material de relleno. Fuera de este intervalo, surgen los siguientes problemas. Si la capacidad de intercambio está por debajo de 1 µeq/g, se vuelve difícil que una reacción de intercambio asociada con una muestra a medir produzca como resultado las resoluciones reducidas. Si la capacidad de intercambio supera 100 µeq/g, requiere un largo periodo antes de que el interior de una columna llegue a equilibrio, dando como resultado el periodo de medición prolongado y la resistencia a la presión reducida.

En la presente invención, el diámetro medio de poro, el área superficial específica, el volumen de poro y la capacidad de intercambio iónico, deben estar dentro de los intervalos especificados anteriormente, respectivamente. Éstas son características esenciales de la presente invención. Se vuelve difícil obtener efectos ventajosos de la presente invención a menos que todas y cada una de las propiedades físicas enumeradas anteriormente estén dentro del intervalo especificado.

Preferentemente, el material de relleno, tal como se describe en el presente documento, tiene un diámetro medio de partícula de 1 - 20 µm con un valor de CV preferido (%) = 40% o menos. Si fuera necesario, puede someterse a un proceso de clasificación en seco o en húmedo conocido para ajustar su diámetro medio de partícula y valor de CV dentro de los intervalos especificados anteriormente.

El material de relleno tal como se describe en el presente documento se usa generalmente en forma de relleno en una columna de acero inoxidable. La técnica usada para rellenar la columna con el material de relleno no está particularmente especificada. Sin embargo, el uso de un proceso en húmedo (proceso de suspensión) se prefiere particularmente. En el proceso en húmedo, el material de relleno se introduce como relleno en la columna permitiéndole dispersarse en un medio de elución y a continuación pasar a presión a través de un rellador y otros dispositivos al interior de una columna.

En la presente invención, se usa, preferentemente, un filtro de LC que comprende al menos un material inerte seleccionado entre poliéter cetonas y polietilenos.

El material inerte, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un material inerte convencionalmente conocido como útil para análisis de muestras biológicas. El uso de este material inerte reduce la aparición de obturación durante una vida útil del filtro de larga duración.

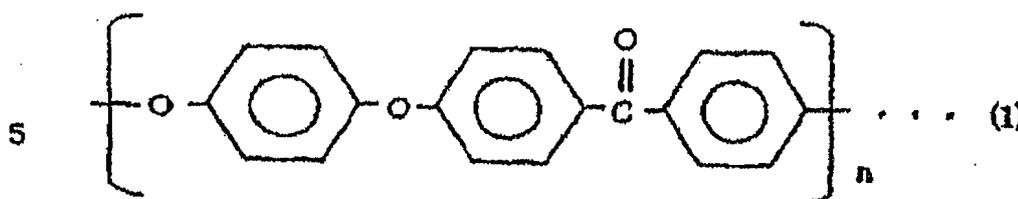
El filtro de LC que comprende el material interno mencionado anteriormente se ha diseñado tomando como base los siguientes descubrimientos. Es decir, el uso del filtro de acero inoxidable convencional en la determinación de hemoglobinas de acuerdo con la presente invención dio como resultado la tendencia incrementada de hemoglobinas y otros componentes presentes en una muestra de sangre a volverse adsorbidas al filtro, lo que causaba la mala separación de los mismos y la aparición incrementada de obturación. Se ha descubierto que dichos problemas pueden resolverse sustituyendo el material del filtro por el material inerte descrito anteriormente.

A pesar de lo anterior, si existe una posibilidad de que los componentes presentes en la muestra puedan adsorberse al filtro de una manera que afecte a las mediciones, puede usarse un agente bloqueante preferentemente para bloquear el filtro y/o la columna. Ejemplos específicos de dichos agentes bloqueantes incluyen proteínas tales como

albúmina de suero bovino, caseína, gelatina, hemoglobina y mioglobina; lípidos polares tales como fosfolípidos; tensioactivos tales como dodecilsulfato sódico, y éter mono-4-octilfenílico de polietilenglicol (Triton X-100); y similares.

- 5 Las poliéter cetonas, tal como se han descrito anteriormente, son polímeros cristalinos refractarios que tienen una estructura combinada de fenil cetona y éter fenílico, cuyos ejemplos incluyen poliéter éter cetona (denominada generalmente resina PEEK) representada mediante la siguiente fórmula química (1); polialil éter cetona; poliéter cetona cetona; poliéter cetona éter cetona cetona; y similares. Se prefiere particularmente poliéter éter cetona.

[Fórmula química I]



- 10 El filtro de LC, tal como se describe en el presente documento, puede estar compuesto por material que contiene al menos uno de poliéter cetona y polietileno. Los ejemplos de dichos materiales incluyen una única sustancia de poliéter cetona o polietileno; una mezcla de poliéter cetona y fluororresina, una mezcla de polietileno y fluororresina; y similares.

- 15 El filtro, tal como se describe en el presente documento, puede construirse en cualquier configuración, siempre que no cause un flujo de fluido turbulento. Por ejemplo, puede estar construido en diversas configuraciones, tal como se muestra en la figura 26, incluyendo (a) un cilindro, (b) cono, (c) cono truncado, (d) combinación de cilindro y cono, (e) combinación de cono truncado y cilindro y (f) combinación de dos conos.

- 20 El filtro de la presente invención está dimensionado para tener un diámetro preferentemente de 1 - 100 mm y más preferentemente de 2 - 50 mm, y un grosor preferentemente de 0,1 - 10 mm y más preferentemente de 0,5 - 5 mm. El filtro tiene poros con un diámetro medio generalmente conocido en la técnica, preferentemente en el intervalo de 0,1 - 20 μm , más preferentemente en el intervalo de 0,2 - 10 μm .

El filtro, tal como se describe en el presente documento, puede usarse como un filtro de línea para LC, o como un filtro en la entrada o la salida de una columna.

- 25 La figura 27 es una vista de sección de un filtro de línea 15 que está construido en una configuración mediante la cual el filtro 11, tal como se describe en el presente documento, está montado en un soporte 13. En este filtro de línea 15, el filtro 11, tal como se describe en el presente documento, está alojado dentro del soporte 13.

- 30 Si fuera necesario, un miembro de junta 12 puede estar provisto para mantener una junta hermética al aire entre el soporte 13 y el filtro 11. Específicamente, el miembro de junta 12 puede estar dispuesto de forma circunferencial respecto al filtro 11 para establecer una junta hermética al aire entre el soporte 13 y el filtro 11, tal como se muestra en las figuras 28(a) y 28(b).

El tipo de material del miembro de junta no se ha especificado particularmente, siempre que tenga una resistencia suficiente para sostener el filtro. Los ejemplos de tipos de material incluyen poliéter cetonas, una fluororresina, una mezcla de poliéter éter cetona y una fluororresina y acero inoxidable. Preferentemente, el miembro de junta está dimensionado y configurado de modo que se adapte a una forma del filtro y limite la difusión de una muestra.

- 35 La columna de LC, tal como se describe en el presente documento, se caracteriza por incorporar el filtro de LC, tal como se describe en el presente documento.

La columna de LC, tal como se ha descrito, se describirá a continuación.

La columna de LC, tal como se describe en el presente documento, usa el filtro, tal como se describe en el presente documento, como su filtro de entrada y un filtro de salida.

- 40 Tal como se muestra en la figura 29, la columna de LC, tal como se describe en el presente documento, es de construcción similar a columnas de LC conocidas convencionales en la técnica, exceptuando el uso del filtro, tal como se describe en el presente documento, como filtro 11. En la figura 29, el número de referencia 40 indica el cuerpo principal de una columna de separación y el número de referencia 42 indica un accesorio terminal.

El reactivo hemolizante para uso en la presente invención es un reactivo hemolizante que puede utilizarse para

hemolizar una muestra de sangre en el método para determinar hemoglobinas de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, el reactivo hemolizante contiene un ion caotrópico que es eficaz para mejorar adicionalmente la separación de HbA_{1c} estable. Los detalles del ion caotrópico usado son similares a los descritos en la primera invención.

5 Más preferentemente, el reactivo hemolizante también contiene un agente tamponante que muestra una acción de tampón en el intervalo de pH de 5,0 - 10,0. El pH del reactivo hemolizante usado en la presente invención está en el intervalo de 5,0 - 10,0, preferentemente en el intervalo de 5,5 - 9,5, más preferentemente en el intervalo de 6,0 - 9,0. Si el pH es menor de 5,0 o mayor de 10,0, se provoca que se produzca la modificación de las hemoglobinas.

10 El equipo de LC para uso en la presente invención puede tener una construcción conocida en la técnica, tal como incluyendo una bomba de suministro de líquidos, un dispositivo de inyección de muestras (inyector), una columna y un detector. Otros dispositivos suplementarios (tales como un baño a temperatura constante para la columna y un dispositivo desaireador para un eluyente) pueden incorporarse, además, cuando sea necesario.

15 Otras condiciones aplicables al método de determinación descrito anteriormente se conocen generalmente en la técnica. El caudal del eluyente es preferentemente 0,05 - 5 ml/min, más preferentemente 0,2 - 3 ml/min. Aunque no limitante, una luz visible a 415 nm puede usarse preferentemente para detectar hemoglobinas. Una muestra sometida a medición se prepara generalmente diluyendo un líquido hemolizado derivado mediante hemólisis con una solución que contiene un material capaz de activar hemólisis, tal como un tensioactivo. La cantidad de la muestra inyectada varía dependiendo de la relación de dilución de la muestra de sangre, y puede estar, preferentemente, en el intervalo aproximado de 0,1 - 100 µl.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo 1;

La figura 2 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo 1;

25 La figura 3 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo 1;

La figura 4 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 1;

30 La figura 5 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 1;

La figura 6 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 1;

La figura 7 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo 5;

35 La figura 8 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo 5;

La figura 9 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo 5;

40 La figura 10 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 3;

La figura 11 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 3;

La figura 12 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo comparativo 3;

45 La figura 13 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo 9;

La figura 14 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo 9;

50 La figura 15 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo 9;

- La figura 16 es una vista esquemática que muestra una construcción ejemplar de un aparato para uso en el proceso de elución escalonado;
- La figura 17 muestra una condición en la que los eluyentes del ejemplo 13 se hacen pasar secuencialmente a través de una columna y un cromatograma resultante;
- 5 La figura 18 muestra una condición en la que los eluyentes del ejemplo comparativo 5 se hacen pasar secuencialmente a través de una columna y un cromatograma resultante;
- La figura 19 muestra una condición en la que los eluyentes del ejemplo comparativo 6 se hacen pasar secuencialmente a través de una columna y un cromatograma resultante;
- 10 La figura 20 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas se llevó a cabo utilizando el material de relleno obtenido en el ejemplo 14;
- La figura 21 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas se llevó a cabo utilizando el material de relleno obtenido en el ejemplo comparativo 7;
- La figura 22 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas se llevó a cabo utilizando el material de relleno obtenido en el ejemplo comparativo 8;
- 15 La figura 23 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas anormales se llevó a cabo utilizando el material de relleno obtenido en el ejemplo 14;
- La figura 24 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas anormales se llevó a cabo utilizando el material de relleno obtenido en el ejemplo comparativo 7;
- 20 La figura 25 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de durabilidad de la columna con el uso de los materiales de relleno obtenidos en el ejemplo 14, los ejemplos comparativos 7 y 8;
- La figura 26 son representaciones seccionales de diversas formas de filtros de LC, tal como se usan en la presente invención;
- La figura 27 es una vista de sección de un filtro de línea que incorpora el filtro, tal como se usa en la presente invención, montado en un soporte;
- 25 Las figuras 28 (a) y (b) son una vista de sección y una vista en planta del filtro de LC, tal como se usa en la presente invención, respectivamente;
- La figura 29 es una vista de sección que ilustra la columna de LC, tal como se usa en la presente invención;
- La figura 30 son cromatogramas obtenidos cuando la medición de una muestra se llevó a cabo (a) sin el uso del filtro de línea, (b) con el uso de los filtros de línea de los ejemplos 15 - 17, y (c) con el uso del filtro de línea del ejemplo comparativo 9;
- 30 La figura 31 son cromatogramas obtenidos cuando la medición de una muestra se realizó (a) con el uso de la columna del ejemplo 18 y (b) con el uso de la columna del ejemplo comparativo 10;
- La figura 32 es un gráfico para explicar el proceso de elución con gradiente;
- La figura 33 es un gráfico para explicar el proceso de elución escalonado;
- 35 La figura 34 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra a) se realizó en las condiciones del ejemplo 22;
- La figura 35 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra b) se realizó en las condiciones del ejemplo 22; y
- 40 La figura 36 es un cromatograma obtenido cuando la determinación de hemoglobinas (muestra c) se realizó en las condiciones del ejemplo 22.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

La presente invención se describe a continuación en detalle con referencia a ejemplos y ejemplos comparativos no limitantes.

(EJEMPLO 1)

- 45 Preparación de material de relleno

5 1,5 g de peróxido de benzoílo (producto de Wako Co., Ltd.) se dejaron disolver en una mezcla que contenía 400 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol (producto de Shin-Nakamura Chem. Co., Ltd.) y 150 g de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico. La mezcla resultante se dispersó en 2500 ml de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico (producto de Nippon Gosei Chem. Co., Ltd.), se calentó con agitación en una atmósfera de nitrógeno a 75°C y a continuación se le dejó polimerizar durante 8 horas. Seguidamente, los polímeros se lavaron, se secaron y se clasificaron para obtener partículas con un diámetro medio de partícula de 6 µm.

Introducción del material como relleno en una columna

Las partículas obtenidas se introdujeron como relleno en una columna de acuerdo con el siguiente procedimiento.

10 0,7 g de las partículas obtenidas anteriormente se dispersaron en 30 ml de un tampón fosfato 50 mM (pH 5,8), se sometieron a un tratamiento ultrasónico durante 5 minutos y se agitaron bien. Todo el contenido se introdujo en un rellenedor (producto de Umetani Seiki Co., Ltd.) conectado a una columna de acero inoxidable vacía (diámetro interno 4,6 x 30 mm). El contenido se introdujo como relleno a una presión constante de 300 kg/cm² en la columna mediante una bomba de suministro (producto de Sanuki Ind. Co., Ltd.) conectada a ella.

Medición de hemoglobinas

15 Usando la columna rellena, se midieron las hemoglobinas en las siguientes condiciones.

(Condiciones de medición)

Sistema:

bomba de suministro: LC-9A (fabricada por Shimadzu Co., Ltd.)

autoinyector: ASU-420 (fabricado por Sekisui Chem. Co., Ltd.)

20 detector: SPD-6AV (fabricado por Shimadzu Co., Ltd.)

Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 50 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 50 mM

eluyente B: tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 200 mM

25 Los valores de pKa del fosfato se indican en la tabla 1. El eluyente A se suministró durante el periodo inicial de 3 minutos, el eluyente B durante el periodo de 0,2 minutos subsiguiente y de nuevo el eluyente A durante el periodo de final de 1,8 minutos.

Caudal: 2,0 ml/min

Longitud de onda de detección: 415 nm

Inyección de muestra: 10 µl

30 (Muestras de medición)

Se prepararon las siguientes muestras a partir de una muestra de sangre completa recogida con fluoruro sódico de un ser humano sano. Una solución de tampón fosfato (pH 7,0) que contenía éter mono-4-octilfenílico de polietilenglicol al 0,1% en peso (Triton X-100) (producto de Tokyo Chemical Industry, Ltd.) se usó como reactivo hemolizante.

35 a) Muestra con adición de glucosa: 500 mg/dl de una solución acuosa de glucosa se añadieron a la muestra de sangre completa y se dejaron reaccionar a 37°C durante 3 horas. El resultante se sometió a continuación a hemólisis por el agente hemolizante mencionado anteriormente, seguida por dilución 150 veces. Como resultado, se obtuvo una muestra a.

40 b) Muestra que contiene CHb: 1 ml de solución de cianato sódico al 0,3% en peso en solución salina se añadieron a 10 ml de la muestra de sangre completa y se dejaron reaccionar a 37°C durante 3 horas. El resultante se sometió posteriormente a hemólisis por el agente hemolizante mencionado anteriormente, seguida por dilución 150 veces. Como resultado, se obtuvo una muestra b.

45 c) Muestra que contiene AHb: 1 ml de solución de acetaldehído al 0,3% en peso en solución salina se añadió a 10 ml de la muestra de sangre completa y se dejaron reaccionar a 37°C durante 3 horas. El resultante se sometió posteriormente a hemólisis mediante el agente hemolizante mencionado anteriormente, seguida por dilución 150 veces. Como resultado, se obtuvo una muestra c.

(Resultados de la medición)

5 Los cromatogramas obtenidos cuando la medición de la muestra se realizó en las condiciones especificadas anteriormente se muestran en las figuras 1 - 3. Las figuras 1 - 3 muestran los resultados medidos para las muestras, a, b y c. El pico 1 representa HbA_{1a} y HbA_{1b}. El pico 2 representa HbF. El pico 3 representa HbA_{1c} lábil. El pico 4 representa HbA_{1c} estable. El pico 5 representa HbA₀. El pico 6 representa CHb y el pico 7 representa AHb.

En la figura 1, los picos 3 y 4 están bien separados entre sí. El pico 6 (CHb) está bien separado del pico 4 en la figura 2. El pico 7 (AHb) está bien separado del pico 4 en la figura 3.

(EJEMPLO 2)

10 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 1 - 3.

Eluyentes:

eluyente A: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 55 mM

eluyente B: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 250 mM

15 Los valores de pKa de succinato se indican en la tabla 1.

(EJEMPLO 3)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 1 - 3.

20 Eluyentes:

eluyente A: maleato 10 mM-tampón fosfato 40 mM (pH 5,3) que contenía nitrato sódico 55 mM eluyente B: maleato 10 mM-tampón fosfato 40 mM (pH 8,3) que contenía nitrato sódico 200 mM

Los valores de pKa de maleato se dan en la tabla 1.

(EJEMPLO 4)

25 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 1 - 3.

Eluyentes:

eluyente A: maleato 10 mM-tampón fosfato 50 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 50 mM

30 eluyente B: maleato 8 mM-tampón fosfato 50 mM (pH 8,3) que contenía ácido perclórico 200 mM

(EJEMPLO COMPARATIVO 1)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes.

Eluyentes:

35 eluyente A: tampón succinato 100 mM (pH 5,4)

eluyente B: tampón succinato 300 mM (pH 8,0)

Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 4 - 6. Las figuras 4 - 6 muestran los resultados de la medición para las muestras a, b y c, respectivamente. A pesar del periodo de medición prolongado, dichos cromatogramas revelan la peor separación en comparación con los mostrados en la figura 1 - 3.

40 (EJEMPLO COMPARATIVO 2)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Los cromatogramas obtenidos eran similares a los mostrados en las figuras 4 - 6.

Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 200 mM (pH 5,4)

eluyente B: tampón fosfato 330 mM (pH 6,0)

(EJEMPLO 5)

- 5 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes.

Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 50 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 55 mM

eluyente B: tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 200 mM

- 10 Durante la medición, el eluyente A se suministró durante el periodo inicial de 3 minutos, el eluyente B durante el periodo de 0,2 minutos subsiguiente y de nuevo el eluyente A durante el periodo de final de 1,8 minutos.

(Resultados de la medición)

- 15 Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 7 - 9. Las figuras 7 - 9 muestran los resultados medidos para las muestras a, b y c, respectivamente. El pico 1 representa HbA_{1a} y HbA_{1b}. El pico 2 representa HbF. El pico 3 representa HbA_{1c} lábil. El pico 4 representa HbA_{1c} estable. El pico 5 representa HbA₀. El pico 6 representa CHb y el pico 7 representa AHb.

En la figura 7, los picos 3 y 4 están bien separados entre sí. El pico 6 (CHb) está bien separado del pico 4 en la figura 8. El pico 7 (AHb) está bien separado del pico 4 en la figura 9.

(EJEMPLO 6)

- 20 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 7 - 9.

Eluyentes:

eluyente A: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía nitrato sódico 48 mM

- 25 eluyente B: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía nitrato sódico 200 mM

(EJEMPLO 7)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 7 - 9.

- 30 Eluyentes:

eluyente A: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 53 mM

eluyente B: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 200 mM

(EJEMPLO 8)

- 35 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 7 - 9.

Eluyentes:

eluyente A: tampón succinato 25 mM (pH 5,3) que contenía nitrato sódico 48 mM

eluyente B: tampón fosfato 30 mM (pH 8,3) que contenía nitrato sódico 200 mM

- 40 (EJEMPLO COMPARATIVO 3)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes.

Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 170 mM (pH 5,3)

eluyente B: tampón fosfato 330 mM (pH 5,7)

5 Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 10 - 12. Las figuras 10 - 12 muestran los resultados medidos para las muestras a, b y c, respectivamente. A pesar del periodo de medición prolongado, dichos cromatogramas revelan una peor separación en comparación con los mostrados en la figura 7 - 9.

(EJEMPLO COMPARATIVO 4)

10 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Los cromatogramas obtenidos eran similares a los mostrados en las figuras 10 - 12.

Eluyentes:

eluyente A: tampón succinato 100 mM (pH 5,6)

eluyente B: tampón succinato 250 mM (pH 6,5)

15 Los cromatogramas obtenidos en los ejemplos 5 - 8 revelan las anchuras del pico de HbA₀ reducidas y resoluciones incrementadas en comparación con los obtenidos en los ejemplos comparativos 3 y 4.

(EJEMPLO 9)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que el número de eluyentes, sus composiciones y condición de suministro se alteraron a las siguientes.

Eluyentes:

20 eluyente A: tampón fosfato 50 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 55 mM

eluyente B: tampón fosfato 50 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 68 mM

eluyente C: tampón fosfato 50 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 200 mM

25 Durante la medición, el eluyente A se suministró durante el periodo inicial de 0,7 minutos, el eluyente B durante el periodo siguiente de 0,7 minutos, el eluyente C durante el periodo siguiente de 0,1 minuto y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 0,4 minutos.

(Resultados de la medición)

30 Los cromatogramas obtenidos se muestran en las figuras 13 - 15. Las figuras 13 - 15 muestran los resultados medidos para las muestras, a, b y c, respectivamente. El pico 1 representa HbA_{1a} y HbA_{1b}. El pico 2 representa HbF. El pico 3 representa HbA_{1c} lábil. El pico 4 representa HbA_{1c} estable. El pico 5 representa HbA₀. El pico 6 representa CHb y El pico 7 representa AHb.

En la figura 13, Los picos 3 y 4 están bien separados entre sí. El pico 6 (CHb) está bien separado del pico 4 en la figura 14. El pico 7 (AHb) está bien separado del pico 4 en la figura 15.

(EJEMPLO 10)

35 La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 9, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 13 - 15.

Eluyentes:

eluyente A: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 48 mM

eluyente B: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 67 mM

40 eluyente C: succinato 25 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 200 mM

(EJEMPLO 11)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 9, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los

mostrados en las figuras 13 - 15.

Eluyentes:

eluyente A: maleato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 53 mM

eluyente B: maleato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 68 mM

5 eluyente C: maleato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,5) que contenía ácido perclórico 200 mM

(EJEMPLO DE REFERENCIA 12)

La medición de hemoglobinas se realizó de la misma manera que en el ejemplo 9, con la excepción de que se cambió la composición de los eluyentes a las siguientes. Se obtuvieron cromatogramas satisfactorios similares a los mostrados en las figuras 13 - 15.

10 Eluyentes:

eluyente A: tampón succinato 25 mM (pH 5,3) que contenía nitrato sódico 48 mM

eluyente B: tampón succinato 25 mM (pH 5,3) que contenía nitrato sódico 71 mM

eluyente C: tampón fosfato 30 mM (pH 8,3) que contenía nitrato sódico 200 mM

(EJEMPLO 13)

15 La medición de las hemoglobinas presentes en una muestra de sangre se llevó a cabo usando el equipo mostrado en la figura 16. Se usó una columna rellena con una resina de intercambio iónico (Micronex A1c HS-IV, producto de Sekisui Chem. Co., Ltd.). Un tampón fosfato 170 mM, un tampón fosfato 190 mM, un tampón fosfato 150 mM y un tampón fosfato 330 mM, que tienen, cada uno, un pH de 6, se usaron como eluyentes A, B, C y D, respectivamente. Se obtuvo una muestra sometiendo a la sangre completa usada en el ejemplo 1 a dilución hemolítica de 100 veces con un reactivo hemolizante. Los eluyentes se suministraron secuencialmente de acuerdo con una técnica de elución de gradiente escalonado de modo que HbA_{1c} (el pico P5 descrito a continuación) se separó de los otros picos de hemoglobina en el plazo de 2 minutos. La secuencia de elución, así como un cromatograma resultante, se muestran en la figura 17. Es decir, el eluyente A se suministró durante un periodo inicial de 38 segundos, el eluyente B que tiene un poder de elución mayor durante el periodo siguiente de 20 segundos, el eluyente C que tiene un poder de elución menor durante el periodo siguiente de 20 segundos, el eluyente D que tiene el poder de elución más alto durante el periodo siguiente de 22 segundos y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 20 segundos. La detección del pico se consiguió a una intensidad de absorción de 415 nm.

En el cromatograma mostrado en la figura 17, los picos P1 - P3 representan HbA_{1a} y HbA_{1b}, un pico P4 representa HbF, un pico P5 representa HbA_{1c}, y un pico P6 representa HbA₀.

30 Durante el procedimiento descrito anteriormente, el eluyente B se cambia al eluyente C que tiene un poder de elución menor. Esto se realiza para prevenir la elución más temprana del pico, P6, que puede ser causada por el incremento del poder de elución cuando el eluyente se cambia de A a B para interferir en la detección precisa del pico de HbA_{1c}, P5.

35 Para evaluar la reproducibilidad, la medición de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente se repitió diez veces para la misma muestra. Para cada medición, el valor de HbA_{1c} se calculó a partir de la siguiente ecuación. Los diez valores de HbA_{1c} resultantes, su valor promedio y un valor de CV (%) se enumeran en la tabla 3.

Valor de HbA_{1c} (%) = (Área bajo el pico P5)/(Área total bajo los picos P1, P2, P3, P4, P5 y P6) x 100

(EJEMPLO COMPARATIVO 5)

40 La medición de las hemoglobinas presentes en la misma muestra que la usada en el ejemplo 13 se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto que no se usó el eluyente C. La secuencia de suministro de los eluyentes, así como un cromatograma resultante, se muestran en la figura 18. Es decir, el eluyente A se suministró durante un periodo inicial de 38 segundos, el eluyente B que tiene un poder de elución más alto durante el periodo siguiente de 40 segundos, el eluyente D que tiene el poder de elución más alto durante el periodo siguiente de 22 segundos y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 20 segundos. Como resultado del incremento de la poder de elución cuando el eluyente se cambió de A a B, el pico P6 se eluyó parcialmente antes y se solapa con el pico P5. Esto se indica mediante una zona rodeada con un círculo en la figura 18.

45 Para evaluar la reproducibilidad, la medición de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente se repitió diez veces para la misma muestra. En cada medición, la concentración de HbA_{1c} se calculó de la misma manera que en el ejemplo 1. Los diez valores de HbA_{1c} resultantes, su valor promedio y un valor de CV (%) se enumeran en la tabla 3.

50

(EJEMPLO COMPARATIVO 6)

La medición de las hemoglobinas presentes en la misma muestra que la usada en el ejemplo 13 se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 13, excepto que no se usó el eluyente C y el eluyente B se sustituyó por el eluyente B1 (tampón fosfato 180 mM con un pH de 6). La secuencia de suministro de los eluyentes, así como un cromatograma resultante, se muestran en la figura 19. Es decir, el eluyente A se suministró durante un periodo inicial de 38 segundos, el eluyente B1 durante el periodo siguiente de 40 segundos, el eluyente D que tiene el poder de elución más alto durante el periodo siguiente de 22 segundos y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 20 segundos. Dado que el eluyente A se cambió al eluyente B1 que tiene un poder de elución menor que el eluyente B, se evitó la dilución más temprana de una parte del pico P6. Sin embargo, el pico P5 se volvió menos nítido y estaba solapado parcialmente por los picos P4 and P6. Esto se indica mediante zonas rodeadas por un círculo en la figura 19.

Para evaluar la reproducibilidad, la medición de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente se repitió diez veces para la misma muestra. Para cada medición, el valor de HbA_{1c} se calculó de la misma manera que en el ejemplo 1. Los diez valores de HbA_{1c} resultantes, su valor promedio y un valor de CV (%) se enumeran en la tabla 3.

[TABLA 3]

	Ej.13	Ej.Comp.5	Ej.Comp.6
Valores medidos (%)	4,55	4,60	4,28
	4,58	4,45	4,58
	4,68	4,44	4,33
	4,58	4,58	4,36
	4,52	4,44	4,60
	4,56	4,38	4,62
	4,55	4,45	4,55
	4,62	4,56	4,32
	4,53	4,38	4,45
	4,55	4,65	4,60
Valor medio (%)	4,55	4,48	4,46
Coefficiente de variación (%)	0,6	1,8	2,8

(EJEMPLO 14)

2,0 g de peróxido de benzoílo se dejaron disolver en 450 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol (producto de Shin-Nakamura Chem. Co., Ltd.). La mezcla se dispersó en 2,5 l de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico.

La dispersión resultante se calentó con agitación en una atmósfera de nitrógeno y se le dejó polimerizar a 80°C durante 1,5 horas y a continuación se enfrió a 35°C. Después de la adición de 200 g de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (producto de Tokyo Chemical Ind. Co., Ltd.) y la siguiente agitación durante 1 hora, al sistema de reacción se le dejó de nuevo polimerizar a 80°C durante 1,3 horas.

Los polímeros resultantes se lavaron y se clasificaron para obtener un material de relleno con un diámetro medio de partícula de 6,5 µm.

(EJEMPLO COMPARATIVO 7)

400 g de metacrilato de 2-hidroxietilo (producto de Shin-Nakamura Chem. Ind. Co., Ltd.), 50 g de dimetacrilato de dietilenglicol, 50 g de metacrilato de metilo y 1,5 g de peróxido de benzoílo se mezclaron y a continuación se dispersaron en 2,5 l de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico. La dispersión se calentó con agitación en una atmósfera de nitrógeno y se le dejó polimerizar a 80°C durante 8 horas.

Los polímeros resultantes se lavaron y se clasificaron para obtener partículas poliméricas con un diámetro medio de partícula de 2,9 μm . 100 g de las partículas poliméricas se dispersaron en 100 ml de una solución acuosa al 20% en peso de hidróxido sódico. 40 g de epiclorhidrina se añadieron a la dispersión que se dejó reaccionar posteriormente durante 5 horas. 100 g de las partículas poliméricas que contienen epoxi resultantes se dispersaron en 100 ml de una solución acuosa al 20% en peso de sulfato sódico y a continuación se les dejó polimerizar a 80°C durante 15 horas. Las partículas poliméricas resultantes se lavaron y se secaron para obtener material de relleno.

(EJEMPLO COMPARATIVO 8)

2,5 g de peróxido de benzoílo se dejaron disolver en 125 g de dimetacrilato de etilenglicol (producto de Shin-Nakamura Chem. Ind. Co., Ltd.). La mezcla se dispersó en 2,5 l de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico y a continuación se calentó con agitación en una atmósfera de nitrógeno a 80°C. Después del lapso de 1 hora, 125 g de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico se añadieron al sistema de reacción que posteriormente se dejó polimerizar adicionalmente a 80°C durante 24 horas.

Los polímeros resultantes se lavaron y se clasificaron para obtener material de relleno con un diámetro medio de partícula de 6,5 μm .

(Evaluación)

(1) Evaluación de propiedades físicas

Los materiales de relleno, después de secarlos, se evaluaron para las propiedades físicas descritas a continuación. La distribución del tamaño de poro, el área superficial específica y el volumen de poro se midieron de acuerdo con una técnica de adsorción de gas mediante un equipo de medición de área superficial específica/distribución del tamaño de poro de alta resolución (NOVA-1200, fabricado por Yuasa Ionics Co., Ltd.). La capacidad de intercambio iónico se determinó mediante un equipo de valoración potenciométrica (AT-310, fabricado por Kyoto Electronic Ind. Co., Ltd.). Los resultados de la medición se dan en la tabla 4.

[TABLA 4]

	Propiedades físicas			
	Diámetro de poro (Å)	Área superficial específica (m^2/g)	Volumen de poro ($\mu\text{l}/\text{g}$)	Capacidad de intercambio iónico ($\mu\text{eq}/\text{g}$)
Ej.14	60	0,68	1,02	65
Ej.Comp.7	<10	5,6	0,31	75
Ej.Comp.8	74	0,96	12,1	185

(2) Introducción del material como relleno en una columna

0,7 g de cada material de relleno se dispersaron en 30 ml de un tampón fosfato 50 mM (pH 6,0), se sometieron a un tratamiento ultrasónico durante 5 minutos y se agitaron bien. Todo el contenido se inyectó en un rellenador (producto de Umetani Seiki Co., Ltd.) conectado a una columna de acero inoxidable vacía (diámetro interno 4,6 x 35 mm). El contenido se introdujo como relleno a una presión constante de 200 kg/cm^2 en la columna por medio de una bomba de suministro (producto de Sanuki Ind. Co., Ltd.) conectada al rellenador.

(Condiciones de medición)

La medición de las hemoglobinas se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que se usaron los eluyentes que tenían las siguientes composiciones.

Eluyentes:

eluyente E: tampón fosfato 15 - 100 mM (pH 5,0 - 6,0) que contenía perclorato

eluyente F: tampón fosfato 300 mM (pH 7,0 - 8,5) que contenía perclorato

La medición de las hemoglobinas se llevó a cabo de acuerdo con una técnica de elución de gradiente escalonado, mientras se conseguía la optimización del tiempo de retención de HbA_{1c} ajustando las concentraciones de sal y los pH de los eluyentes E y F para que estén dentro de los intervalos respectivos especificados anteriormente.

(Resultados de la medición)

La medición de la muestra a se llevó a cabo usando los materiales de relleno obtenidos en el ejemplo 14 y los ejemplos comparativos 7 y 8. Sus resultados se muestran en las figuras 20, 21 y 22, respectivamente.

En las figuras 20 - 24, los números de referencia aplicados a los picos representan lo siguiente.

- 5 21 HbA_{1a} y HbA_{1b}
- 22 HbF
- 23 HbA_{1c} lábil
- 24 HbA_{1c} estable
- 25 HbA₀
- 10 26 HbA₂
- 27 HbS y HbC

Para que HbF y HbA_{1c} estable se cuantifiquen de manera satisfactoria, la elución de hemoglobina debe avanzar en el orden de HbF, HbA_{1c} lábil, HbA_{1c} estable y HbA₀. Esto es porque se volverá extremadamente difícil cuantificar HbF si se eluye, por ejemplo, entre HbA_{1c} estable y HbA₀ cuyos picos son más intensos que el pico de HbF.

- 15 En el caso en el que se usó el material de relleno del ejemplo 14, los picos aparecieron en el orden descrito anteriormente y estaban bien separados a pesar del periodo de medición acortado.

Sin embargo, en el caso en el que se usó el material de relleno del ejemplo comparativo 7, la secuencia de elución se alteró para hacer HbF y HbA_{1c} estable menos determinables. Los materiales de relleno obtenidos en el ejemplo comparativo 7 y 8 revelaron mala separación a pesar del periodo de medición prolongado.

- 20 (5) Medición de Hb anormales

Se preparó una muestra sometiendo una sangre de control (AFSC Control, producto de Helena) que contenía HbA₂, HbS y HbC, como hemoglobinas anormales, a dilución hemolítica de 67 con un reactivo hemolizante, y se midió en las mismas condiciones. Los métodos de relleno del ejemplo 14 y el ejemplo comparativo 7 se usaron para la medición. Los resultados se muestran en las figuras 23 y 24, respectivamente. A pesar del periodo de medición acortado, el material de relleno del ejemplo 14 reveló una separación de picos superior en comparación con el material de relleno del ejemplo comparativo 7.

- 25

(6) Ensayo de vida de la columna

Se preparó una muestra sometiendo una sangre completa a dilución hemolítica 150 veces con un reactivo hemolizante, y se midió repetidamente en las mismas condiciones, tal como se ha descrito anteriormente, para observar la variación del valor de HbA_{1c} estable.

- 30

El valor de HbA_{1c} estable se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Valor de HbA}_{1c} \text{ estable (\%)} = (\text{área del pico de HbA}_{1c} \text{ estable}) / (\text{área total del pico}) \times 100.$$

Los resultados se muestran en la figura 25. Los valores de medición se mantuvieron sin variar durante un periodo de tiempo más largo con el uso del material de relleno del ejemplo 14 que los materiales de relleno de los ejemplos comparativos 7 y 8.

- 35

(7) Ensayo de reproducibilidad

Para cada uno de los materiales de relleno obtenidos en el ejemplo 14 y los ejemplos comparativos 7 y 8, se prepararon 30 unidades (30 lotes) en condiciones idénticas. Usando estos lotes, la medición de una muestra de sangre completa se realizó en las mismas condiciones, tal como se ha descrito anteriormente. Los eluyentes se controlaron de modo que un tiempo de retención de HbA_{1c} estable registró aproximadamente 5,0 minutos. Tal como puede apreciarse a partir de las variaciones del tiempo de retención de HbA_{1c} estable y el valor de HbA_{1c} estable entre lotes, tal como se muestra en la tabla 5, el material de relleno del ejemplo 14 mostraba la reproducibilidad más alta en comparación con los materiales de relleno de los ejemplos comparativos 7 y 8. Para el material de relleno del ejemplo comparativo 8, siete lotes, de 30 lotes, se acompañaron con la producción de agregados, durante la polimerización, que impidió su introducción como relleno en una columna.

- 40
- 45

[TABLA 5]

	Número de lotes	Tiempo de retención de HbAlc estable (Min.)	Valor de HbAlc estable (%)
Ej.14	30	5,0 ± 0,4	4,7 ± 0,2
Ej.Comp.7	30	5,1 ± 1,2	4,8 ± 1,1
Ej.Comp.8	23	5,0 ± 3,6	2,4 ± 1,5

(EJEMPLO 15)

5 Una mezcla equivalente de poliéter éter cetona y una resina de flúor se sinterizó en un molde para producir un filtro integral 11 mostrado en la figura 26(a). El filtro se construyó en una configuración cilíndrica que tiene un diámetro de 5 mm y un grosor de 1,5 mm, con un tamaño de poro de 2 μ m.

El filtro 11 se insertó en un miembro de junta 12 compuesto por poliéter éter cetona y a continuación se montó en un soporte de acero inoxidable 13 (ángulo vertical A = 90 grados), tal como se muestra en la figura 27. Posteriormente, las mitades 13a y 13b se conectaron entre sí a lo largo de roscas. Como resultado, se ensambló un filtro de línea 15.

10 (EJEMPLO 16)

Un filtro integral 11 fabricado de la misma manera que en el ejemplo 15 se insertó en un miembro de junta 12 compuesto por poliéter éter cetona y a continuación se montó en un soporte 13 (ángulo vertical A = 150 grados) también compuesto por poliéter éter cetona. Posteriormente, las mitades 13a y 13b se conectaron entre sí a lo largo de roscas. Como resultado, se ensambló un filtro de línea 15.

15 (EJEMPLO 17)

Polietileno se sinterizó en un molde para producir un filtro integral 11 mostrado en la figura 26(a). El filtro se construyó en una configuración cilíndrica que tenía un diámetro de 5 mm y un grosor de 1,5 mm, con un tamaño de poro de 2 μ m.

20 El filtro 11 se insertó en un miembro de junta 12 compuesto por poliéter éter cetona y a continuación se montó en un soporte 13 (ángulo vertical A = 150 grados) también compuesto por poliéter éter cetona, tal como se muestra en la figura 27. Posteriormente, las mitades 13a y 13b se conectaron entre sí a lo largo de roscas. Como resultado, se ensambló un filtro de línea 15.

(EJEMPLO COMPARATIVO 9)

25 Polvos metálicos se sinterizaron en un molde para producir un filtro de acero inoxidable integral 11 mostrado en la figura 26(a). El filtro se construyó en una configuración cilíndrica que tiene un diámetro de 5 mm y un grosor de 1,5 mm, con un tamaño de poro de 2 μ m.

El filtro 11 se insertó en un miembro de junta 12 formado de una resina de flúor y a continuación se montó en un soporte de acero inoxidable 13 (ángulo vertical A = 90 grados). Posteriormente, las mitades 13a y 13b se conectaron entre sí a lo largo de roscas. Como resultado, se ensambló un filtro de línea 15.

30 Usando los filtros de línea ensamblados en los ejemplos 15 - 17 y el ejemplo comparativo 9, (1) la adsorividad de una muestra biológica y (2) la relación entre la adsorividad de la muestra biológica y el pH del eluyente (pH 5,0, pH 6,0 y pH 7,0) se evaluaron de acuerdo con los siguientes procedimientos.

(1) Evaluación de adsorividad

35 Para evaluar la adsorividad de la muestra biológica, la medición de las hemoglobinas se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, excepto que las composiciones y la secuencia de suministro de eluyentes se alteraron a las especificadas a continuación y que los filtros de línea ensamblados en los ejemplos 15 - 17 y el ejemplo comparativo 9 se usaron en solitario (es decir, sin usar una columna). La muestra a en el ejemplo 1 se usó como muestra de medición.

(Condiciones de medición)

40 Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 100 mM (pH 5,8)

eluyente B: tampón fosfato 300 mM (pH 6,8)

El eluyente A se suministró durante el periodo inicial de 3 minutos, el eluyente B durante el periodo subsiguiente de 2 minutos y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 5 minutos.

(Resultados de la medición)

5 Los cromatogramas representativos que eran resultado de la medición de la muestra en las condiciones de medición descritas anteriormente se muestran en la figura 30(a) (no se usó filtro en línea), la figura 30(b) (se usaron los filtros de línea de los ejemplos 15 - 17), y la figura 30(c) (se usó el filtro de línea del ejemplo comparativo 9). Un pico 61 indica un pico de hemoglobina (aparecía un único pico debido a la ausencia de separación de columnas). La aparición de un pico 62 se considera debida a la desorción por el eluyente B de hemoglobinas una vez adsorbidas al filtro mediante la implicación del eluyente A.

Método de evaluación

15 Un área de un pico de hemoglobina producido cuando se llevó a cabo la medición de la muestra sin un filtro de línea se registró como el 100%. Tomando esto como un control, se calculó un área de un pico de hemoglobina (un área de cada pico 61) producida con el uso de cada uno de los filtros de línea ensamblados en los ejemplos 15 - 17 y el ejemplo comparativo 9. A continuación, una recuperación (%) de hemoglobina mediante el eluyente A se calculó a partir de la siguiente ecuación. Los resultados se dan en la tabla 6. La medición se repitió tres veces para cada filtro de línea.

Recuperación (%) = (área de un pico de hemoglobina producido cuando se fijó cada filtro de línea) / (área de un pico de hemoglobina producido cuando no se fijó ningún filtro de línea) x 100

20 Aunque el ejemplo comparativo 9 reveló una recuperación promedio del 57,4%, los ejemplos 15 - 17 revelaron recuperaciones del 95,3 %, el 98,5 % y el 98,0 %, respectivamente.

Estos resultados demuestran que la adsorción de hemoglobina se reducía utilizando los filtros de línea de los ejemplos 15 - 17 en comparación con la utilización del filtro de línea del ejemplo comparativo 9.

[TABLA 6]

No.	Ej.15	Ej.16	Ej.17	Ej.21	Ej. Comp. 9
1	94,1	98,7	97,9	96,1	50,9
2	96,4	97,8	97,9	97,3	57,8
3	95,3	98,9	98,1	96,5	63,4
Valor medio	96,3	98,5	98,0	96,6	57,4
Desviación estándar	1,2	0,6	0,1	0,6	6,3
CV (%)	1,2	0,6	0,1	0,6	10,9

25 En la tabla 6 (también en la tabla 7 que se da a continuación), un valor de CV (%) se refiere a un coeficiente de variación (es decir, valor de CV (%) = (desviación estándar)/(media aritmética) x 100). El valor de CV se incrementa marcadamente utilizando el filtro de línea del ejemplo comparativo 9 en comparación con utilizando los filtros de línea de los ejemplos 15 - 17. Esto demuestra que el uso del filtro de línea del ejemplo comparativo 9 da como resultado la variación incrementada de la adsorción de hemoglobina.

(2) Evaluación de la relación entre la adsorividad de una muestra biológica y el pH del eluyente

35 Para evaluar la relación entre la adsorividad de una muestra biológica y el pH del eluyente, la medición de las hemoglobinas se llevó a cabo en las mismas condiciones que en la evaluación de adsorividad de una muestra biológica descrita anteriormente, excepto que el pH del eluyente A se modificó a pH 5,0, pH 6,0 y pH 7,0. Los filtros de línea ensamblados en los ejemplos 15 - 17 y el ejemplo comparativo 9 se usaron en solitario (es decir, no se usó ninguna columna).

Método de evaluación

Un área de un pico de hemoglobina producido cuando la medición de la muestra se llevó a cabo sin un filtro de línea se registró como el 100%. Tomando esto como un control, un área de un pico de hemoglobina se calculó a partir de

la medición (n=5) usando cada uno de los filtros de línea ensamblados en los ejemplos 15 - 17 y el ejemplo comparativo 9. A continuación, una recuperación de hemoglobina (%) mediante el eluyente A se calculó a partir de la siguiente ecuación. Los resultados se dan en la tabla 7.

5 **Recuperación (%) = (área de un pico de hemoglobina producido cuando se fijó cada filtro de línea) / (área de un pico de hemoglobina producido cuando no se fijó ningún filtro de línea) x 100**

El ejemplo comparativo 9 proporcionó recuperaciones promedio del 13,56% a pH 5,0, el 76,52% a pH 6,0 y el 91,98% a pH 7,0. El valor de CV (%) se incrementaba con un pH decreciente y suponía el 37,27 % a pH 5,0.

El ejemplo 15 proporcionó recuperaciones promedio del 97,42% a pH 5,0, el 97,82% a pH 6,0 y el 97,20% a pH 7,0.

El ejemplo 16 proporcionó recuperaciones promedio del 98,56% a pH 5,0, el 98,76% a pH 6,0 y el 98,82% a pH 7,0.

10 El ejemplo 17 proporcionó recuperaciones promedio del 97,72% a pH 5,0, el 98,22% a pH 6,0 y el 98,46% a pH 7,0.

[TABLA 7]

N.º	Ej.Comp.9			Ej.15			Ej.16			Ej.17		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
1	21,2	60,1	94,5	97,4	97,7	97,8	98,4	98,7	99,4	96,8	97,8	98,1
2	15,8	78,3	96,4	98,2	98,1	97,6	98,6	98,1	99,1	97,9	98,1	98,6
3	12,3	81,2	90,5	96,8	98,5	97,1	98,1	99,5	98,1	97,6	98,9	98,1
4	9,4	83,5	93,4	97,6	97,4	96,8	98,2	99,4	98,4	98,1	98,2	98,4
5	9,1	79,5	85,1	97,1	97,4	96,7	99,5	98,1	99,1	98,2	98,1	99,1
Valor medio	13,56	76,52	91,98	97,42	97,82	97,20	98,56	98,76	98,82	97,72	98,22	98,46
Desviación estándar	5,05	9,38	4,40	0,53	0,48	0,48	0,56	0,68	0,54	0,56	0,41	0,42
CV (%)	37,27	12,26	4,78	0,55	0,49	0,50	0,57	0,69	- 0,55	0,58	0,42	0,42

El uso de los ejemplos 15 - 17 dio como resultado valores de CV que no superaban el 1% a cualquier pH.

Tal como puede apreciarse a partir de lo anterior, en el caso en el que se usa el filtro de acero inoxidable del ejemplo comparativo 9, la adsorividad de la hemoglobina depende en gran medida del pH del eluyente. El uso del filtro de acero inoxidable da como resultado el marcado incremento de la adsorción de hemoglobina y la amplia variación del porcentaje de adsorción. Se considera, por lo tanto, que el uso del filtro de acero inoxidable para la medición de hemoglobinas acorta su vida útil y dispersa los datos de medición.

Donde se usaron los filtros de los ejemplos 15 - 17, se descubrió que la adsorividad de hemoglobina no resultaba afectada por el pH del eluyente, incluso aunque variara entre 9,0 y cerca de 5,0, y la recuperación alcanzaba casi el 100%.

Lo anterior demuestra que un filtro para uso en la medición de hemoglobinas se construye, preferentemente, a partir de material que contiene poliéter éter cetona o polietileno que sustancialmente impide la adsorción de hemoglobinas a lo largo de un amplio intervalo de pH.

(EJEMPLO 18)

Una mezcla equivalente de poliéter éter cetona y una resina de flúor se sinterizó en un molde para producir un filtro integral 11 mostrado en la figura 26(a). El filtro se construyó en una configuración cilíndrica que tenía un diámetro de 4,8 mm y un grosor de 2 mm, con un tamaño de poro de 2 μm . El filtro 11 se insertó a continuación en un miembro de junta 12 (que tiene un diámetro externo de 6,3 mm, un diámetro interno de 4,8 mm y un grosor de 2,0 mm) compuesto por una resina de flúor y posteriormente montado en un accesorio terminal 42 para fijación a cada extremo de un cuerpo de columna de acero inoxidable 40 (que tiene un diámetro interno de 4,6 mm y una longitud de 30 mm) mostrada en la figura 29.

El material de relleno se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación y a continuación se introdujo como relleno en la columna de acuerdo con el procedimiento tal como se describe en la sección de "Fabricación de una columna" para fabricar la columna de LC de la presente invención.

Preparación de material de relleno

1,5 g de peróxido de benzoilo (iniciador de la polimerización fabricado por Wako Co., Ltd.) se dejaron disolver en una mezcla que contenía 400 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol (producto de Shin-Nakamura Chem. Ind. Co., Ltd.) y 150 g de ácido metacrílico (producto de Wako Co., Ltd.). La mezcla resultante se dispersó en 2.500 ml de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico (Nippon Kagaka Co., Ltd.), se calentó con agitación en una atmósfera de nitrógeno a 75°C, y se le dejó polimerizar durante 8 horas. El polimerizado resultante se lavó, se secó y se clasificó para obtener partículas con un diámetro medio de partícula de 6 μm .

Fabricación de una columna

Para cada columna, 1,0 g del material de relleno preparado anteriormente se dispersó en 30 ml de tampón fosfato 50 mM (pH 6,0). La dispersión se trató supersónicamente durante 5 minutos y a continuación se agitó bien. Todo el contenido se vertió en un rellenador (producto de Umetani Seiki Co., Ltd.) conectado al cuerpo de la columna de acero inoxidable 40 (diámetro interno 4,6 x 30 mm). El contenido se introdujo como relleno a una presión constante de 300 kg/cm² en el cuerpo de la columna de acero inoxidable 40 por medio de una bomba de suministro (producto de Sanuki Kogyo Co., Ltd.) conectado al rellenador. Seguidamente, el accesorio terminal 42 y el cuerpo de la columna 40 se conectaron entre sí a lo largo de roscas. Como resultado, se ensambló la columna de LC de la presente invención.

(EJEMPLO 19)

Se siguió el procedimiento del ejemplo 18, con la excepción de que polietileno, en lugar de la mezcla equipesante de poliéter éter cetona y una resina de flúor, se sinterizó en un molde para producir el filtro integral 11, para fabricar una columna de LC.

(EJEMPLO COMPARATIVO 10)

Se siguió el procedimiento del ejemplo 18, con la excepción de que polvos metálicos, en lugar de la mezcla equipesante de poliéter éter cetona y una resina de flúor, se sinterizaron en un molde para producir el filtro de acero inoxidable integral 11, para fabricar una columna de LC.

La medición de las hemoglobinas se llevó a cabo en las siguientes condiciones utilizando las columnas obtenidas en los ejemplos 18 y 19 y el ejemplo comparativo 10 (pero exceptuando un filtro de línea) para evaluar sus rendimientos de separación.

Condiciones de medición

La medición de las hemoglobinas se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 1, con la excepción de que el caudal se controló a 1,6 ml/min y las composiciones y la secuencia de suministro de los eluyentes se alteraron a las especificadas a continuación. La muestra a en el ejemplo 1 se usó como muestra de medición.

5 Eluyentes:

eluyente A: tampón fosfato 100 mM (pH 5,8)

eluyente B: tampón fosfato 300 mM (pH 6,8)

El eluyente A se suministró durante el periodo inicial de 5 minutos, el eluyente B durante el periodo subsiguiente de 1 minuto y de nuevo el eluyente A durante el periodo final de 1 minutos.

10 Resultados de la medición

Los cromatogramas obtenidos mediante la medición de la muestra en las condiciones especificadas anteriormente se muestran en la figura 31(a) (se usó la columna del ejemplo 18) y en la figura 31(b) (se usó la columna del ejemplo comparativo 10). El pico 51 representa HbA_{1a} y HbA_{1b}. Los picos 52, 53, 54 y 55 representan HbF, HbA_{1c} lábil, HbA_{1c} estable y HbA₀, respectivamente. Tal como puede verse claramente a partir de los resultados, la columna de cromatografía de líquidos del ejemplo 18 muestra el rendimiento de separación mejorado en comparación con la columna de cromatografía de líquidos del ejemplo comparativo 10. También se descubrió que la columna del ejemplo 19 consigue una buena separación de una manera similar a la columna del ejemplo 18.

15

(EJEMPLO 20)

20

La medición de las Hb (muestra a) se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo comparativo 2, con la excepción de que se usó el siguiente reactivo hemolizante.

(Reactivo hemolizante)

Se añadió guanidina a una solución de tampón fosfato (pH 7,0) (reactivo hemolizante estándar) que contenía éter mono-4-octilfenílico de polietilenglicol al 0,1% en peso (Triton X-100) a una concentración de 100 mM.

(Resultados de la medición)

25

El cromatograma obtenido era similar al mostrado en la figura 1. Tal como puede apreciarse a partir de comparación con el cromatograma (figura 4) del ejemplo comparativo 2, daba como resultado la separación mejorada de cada pico.

(EJEMPLO 21)

30

La recuperación de hemoglobinas se evaluó de la misma manera tal como se ha descrito anteriormente usando el filtro de acero inoxidable del ejemplo comparativo 9 anterior, con la excepción de que se usaron los siguientes eluyentes.

(Eluyentes)

Eluyente A: tampón fosfato 100 mM (pH 5,8) que contenía 100 ppm de 2-aminoetanol

Eluyente B: tampón fosfato 300 mM (pH 6,8)

35

(Resultados de la medición)

La recuperación se mostró en la tabla 6. Aunque el uso del filtro de línea del ejemplo comparativo 9 dio como resultado una baja recuperación, la adición de aminas conseguía una marcada mejora de recuperación.

(EJEMPLO 22)

(Preparación de material de relleno)

40

2,0 g de peróxido de benzoílo se mezclaron y se les dejó disolver en una mezcla que contenía 450 g de dimetacrilato de tetraetilenglicol (producto de Shin-Nakamura Chem. Ind. Co., Ltd.) y 50 g de 2-hidroxi-1,3-metacriloxipropano. La mezcla resultante se dispersó en 2,5 l de una solución acuosa al 4% en peso de alcohol polivinílico.

45

La dispersión se calentó a continuación con agitación en una atmósfera de nitrógeno y se le dejó polimerizar a 80°C durante 1,5 horas. El sistema de reacción se enfrió posteriormente a 35°C. Seguidamente, 400 g de una solución acuosa al 50% de ácido 2-acrilamida-2-metilpropanosulfónico (producto de Tokyo Chemical Ind. Co., Ltd.) y 400 ml de metanol se añadieron al sistema de reacción que posteriormente se agitó durante 1 hora y se le dejó polimerizar

ES 2 563 162 T3

de nuevo a 80 °C durante 1,3 horas.

El polimerizado resultante se lavó y se clasificó para obtener material de relleno con un diámetro medio de partícula de 6,5 µm. El material se introdujo como relleno en una columna de la manera tal como se ha descrito anteriormente.

5 Utilizando la columna obtenida, la medición de las Hb se realizó en las siguientes condiciones.

(Sistema) el sistema era idéntico al empleado en el ejemplo 1.

(Filtro de línea) se usó el filtro de línea de polietileno del ejemplo 17.

10 (Introducción como relleno del material en la columna) se siguió el procedimiento del ejemplo 1. Después de la introducción como relleno, un tampón fosfato 170 mM (pH 5,7) que contenía reactivo de Hb al 0,3% en peso (producto de Difco Laboratories) se hizo pasar a través de la columna a un caudal de 1,5 ml/min durante un periodo de 15 minutos. Posteriormente, un tampón fosfato 170 mM (pH 5,7) se hizo pasar a través de la columna durante un periodo de 15 minutos. Esto permitió estabilización veloz de mediciones durante una fase temprana.

(Otras condiciones)

Longitud de onda de detección: 415 nm

15 Caudal: 1,8 ml/min

Inyección de muestra: 10 µl

(Muestras)

Se usaron las muestras a - c descritas en el ejemplo 1, así como la sangre de control con Hb anormal en el ejemplo 14.

20 (Medición de muestras a - c)

(Condiciones de medición)

(Eluyentes) Se usaron los siguientes tres tipos de eluyentes.

Eluyente A: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 55 mM

Eluyente B: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 70 mM

25 Eluyente C: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 250 mM

(Condición de suministro) De acuerdo con la técnica de elución de gradiente escalonado, los eluyentes se suministraron selectivamente en los siguientes intervalos de tiempo.

0 - 38 segundos: eluyente A

38 - 58 segundos: eluyente B

30 58 - 78 segundos: eluyente A

78 - 100 segundos: eluyente C

100 - 120 segundos: eluyente A

(Resultados de la medición)

35 Los resultados de la medición de las muestras a - c se dan en las figuras 34 - 36, respectivamente. En las figuras 34 - 36, los picos 21 - 25 representan los mismos tipos de hemoglobina que en el ejemplo 14. Los picos 28 y 29 representan CHb y AHb, respectivamente.

En la figura 34, HbA_{1c} lábil y HbA_{1c} estable están bien separados. El pico 28 (CHb) está bien separado del pico 24 en la figura 35. El pico 29 (AHb) está bien separado del pico 24 en la figura 36.

(Medición de muestras que contienen Hb anormal)

40 (Condiciones de medición)

(Eluyentes) Se usaron los siguientes cuatro tipos de eluyentes.

Eluyente A: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 55 mM

Eluyente B: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 5,3) que contenía ácido perclórico 70 mM

Eluyente C: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 8,0) que contenía ácido perclórico 250 mM

Eluyente D: succinato 20 mM-tampón fosfato 20 mM (pH 6,8) que contenía ácido perclórico 70 mM

5 (Condición de suministro) De acuerdo con la técnica de elución de gradiente escalonado, los eluyentes se suministraron selectivamente en los siguientes intervalos de tiempo.

0 - 38 segundos: eluyente A

38 - 58 segundos: eluyente B

58 - 78 segundos: eluyente A

10 78 - 120 segundos: eluyente D

120 - 140 segundos: eluyente C

140 - 180 segundos: eluyente A

(Resultados de la medición)

15 El cromatograma obtenido era similar al mostrado en la figura 23. Después de HbA₀, cada Hb anormal se separó bien.

EFFECTOS DE LA INVENCION

20 Con el uso de los métodos para determinar hemoglobinas de acuerdo con la primera invención de la presente solicitud, el rendimiento de separación de hemoglobina puede mejorarse, el cual ha sido el problema encontrado en los métodos previos para determinar hemoglobinas. Particularmente, HbA_{1c} estable puede separarse con reproducibilidad y precisión altas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar hemoglobinas mediante una cromatografía de líquidos de intercambio catiónico **caracterizado por** el uso de un eluyente que contiene perclorato como ion caotrópico y además un ácido inorgánico, un ácido orgánico y/o cualquier sal de los mismos que tienen una capacidad tamponante en el intervalo de pH de 4,0 - 6,8.
- 10 2. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el eluyente, cuando entra en una columna, tiene un pH igual a o desplazado a un lado alcalino con respecto a un punto isoeléctrico de hemoglobina de modo que HbA₀ pueda eluirse.
3. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** el pH de dicho eluyente es al menos 6,8.
- 15 4. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, **caracterizado porque** se usan al menos tres tipos de eluyentes que tienen diferentes poderes de elución y porque, antes de que se suministre un tipo de eluyente destinado a eluir HbA₀, se suministran los otros tipos de eluyentes.
- 20 5. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el eluyente está controlado para reducir su poder de elución en el transcurso del suministro de acuerdo con un gradiente o técnica de elución de gradiente escalonado.
- 25 6. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque**, posterior a la elución de HbA₀, se eluye al menos una hemoglobina del grupo que consiste en HbA₂, HbS y HbC.
- 30 7. El método para determinar hemoglobinas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por** el uso de un reactivo hemolizante que contiene al menos un tipo de amina que tiene un peso molecular de 20 - 500.

FIG. 1

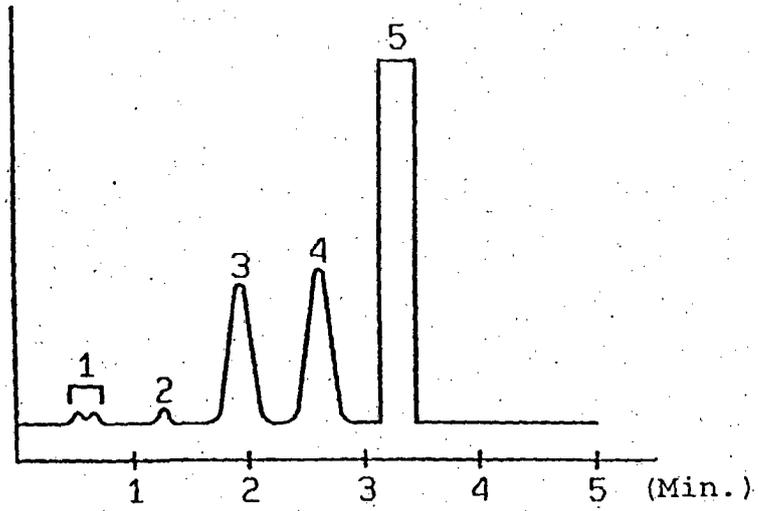


FIG. 2

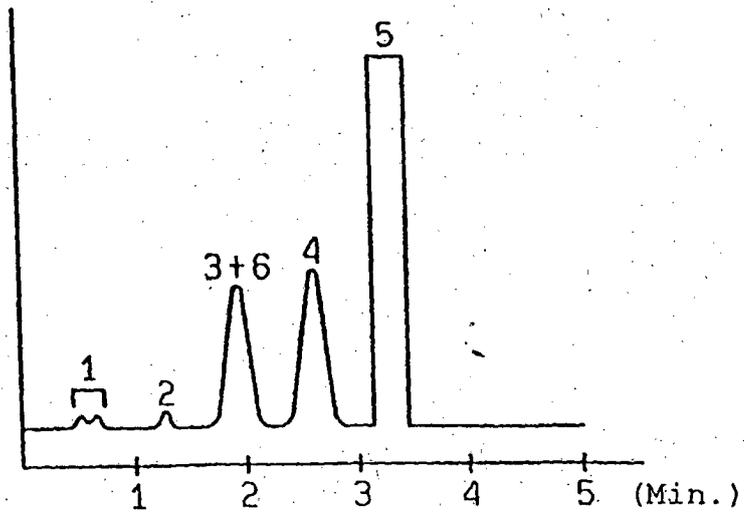


FIG. 3

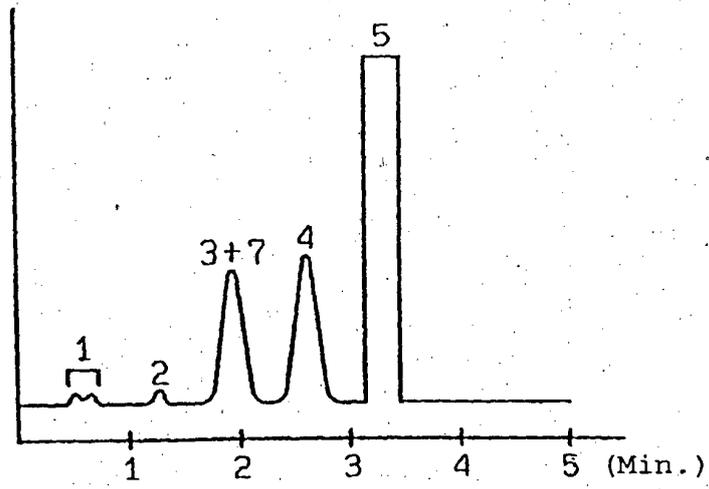


FIG. 4

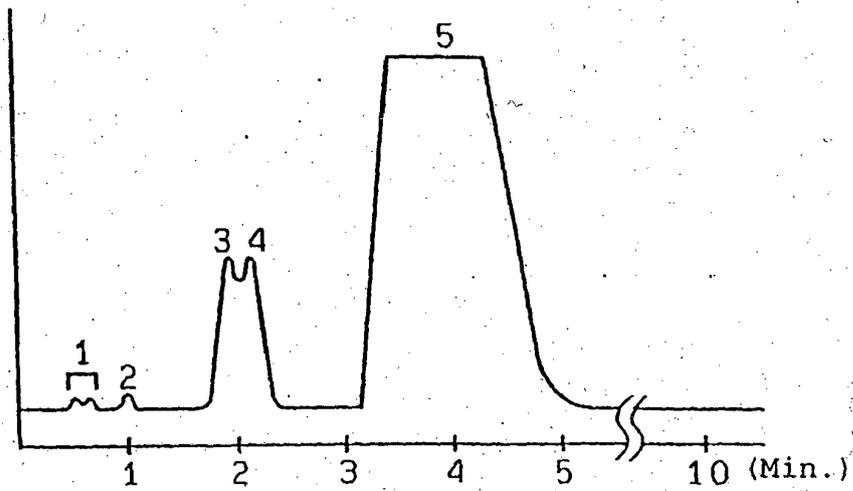


FIG. 5

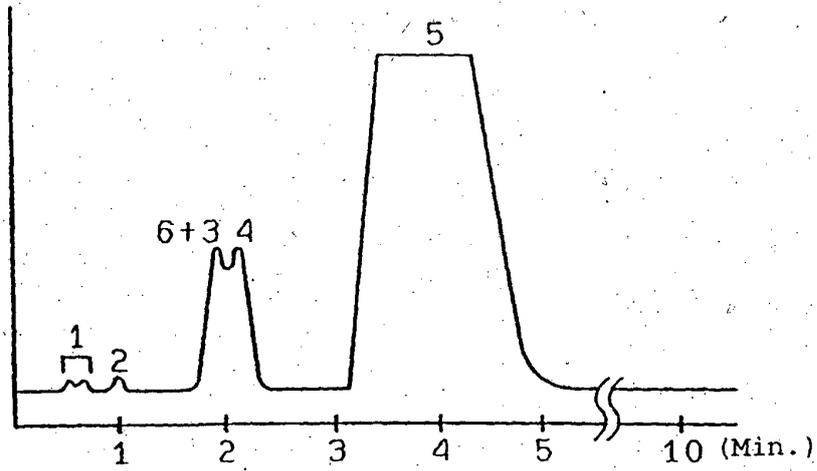


FIG. 6

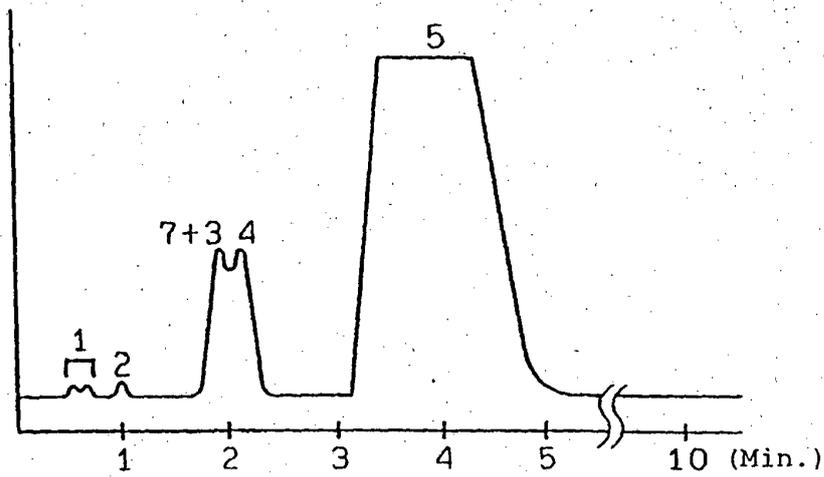


FIG. 7

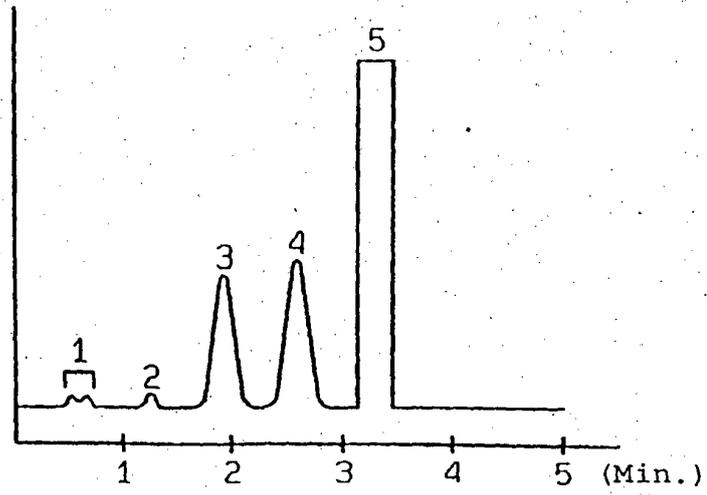


FIG. 8

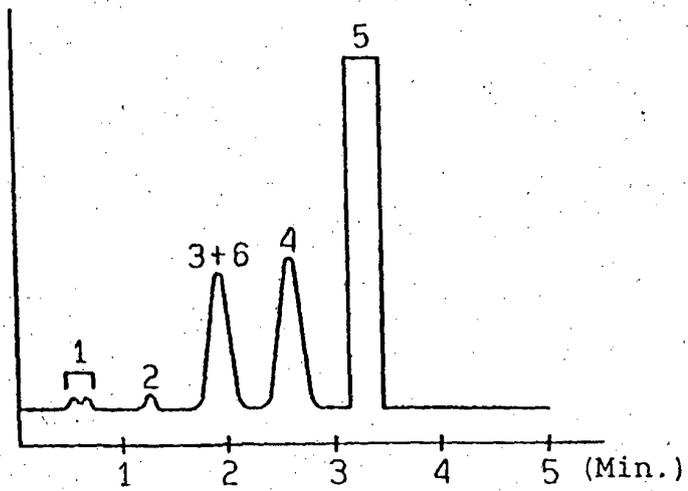


FIG. 9

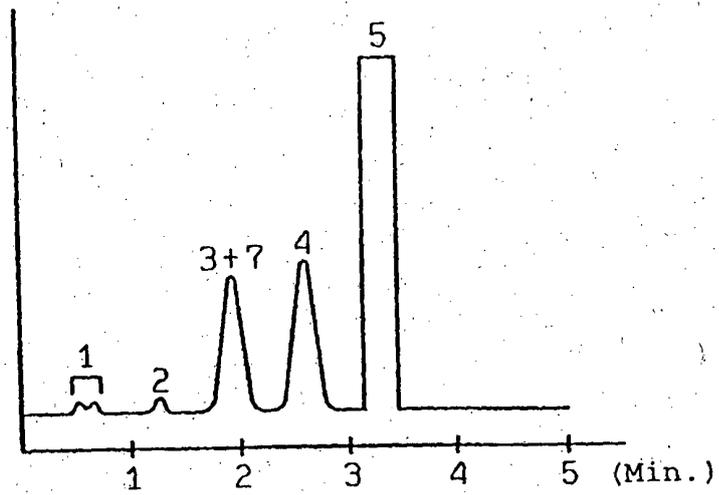


FIG. 10

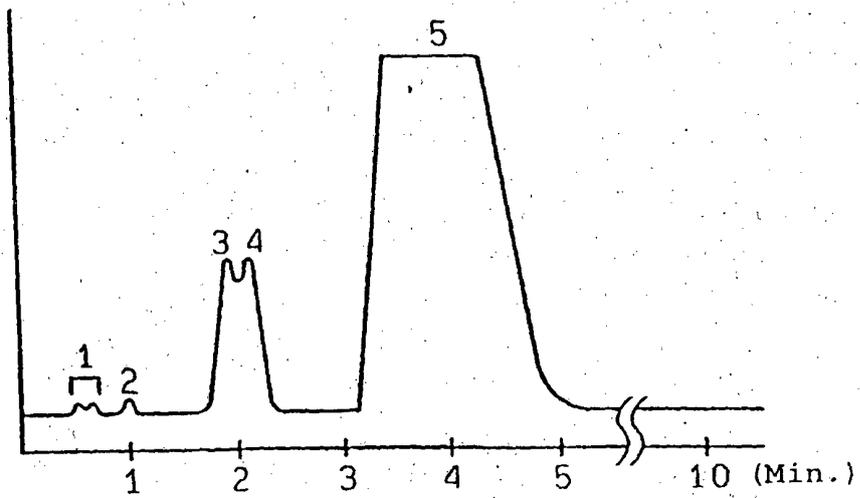


FIG. 11

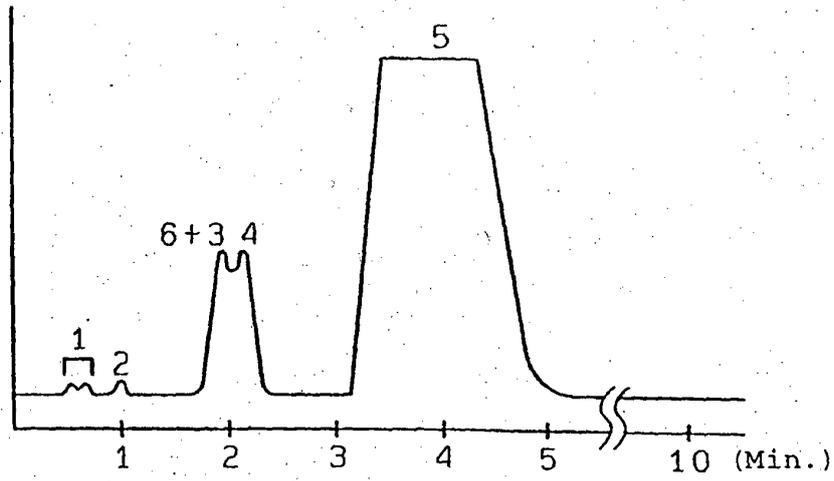


FIG. 12

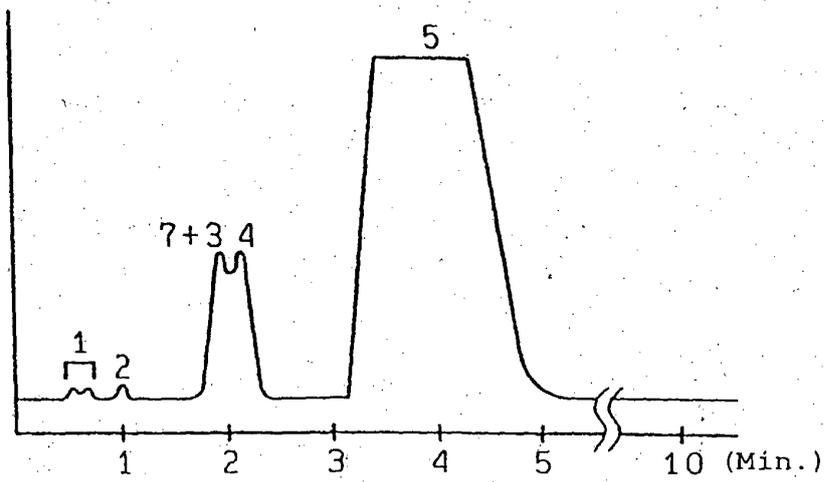


FIG. 13

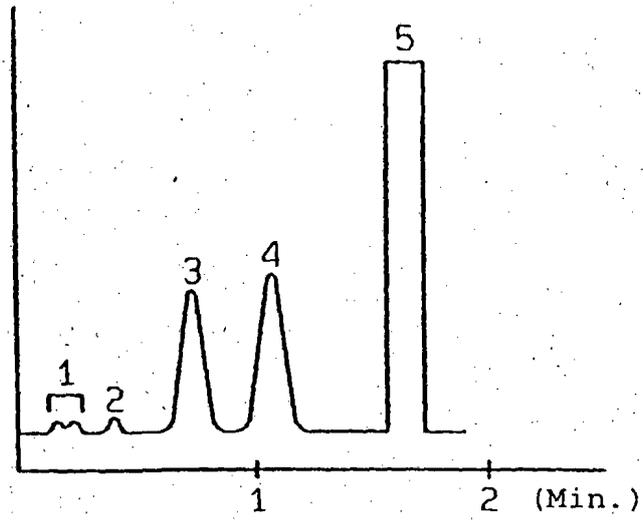


FIG. 14

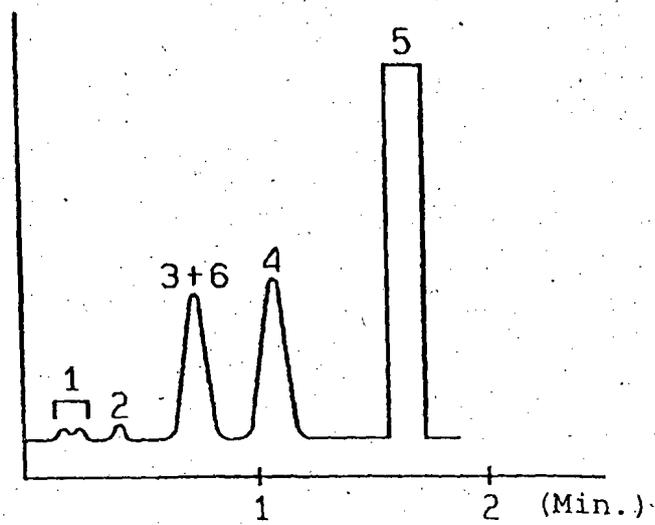


FIG. 15

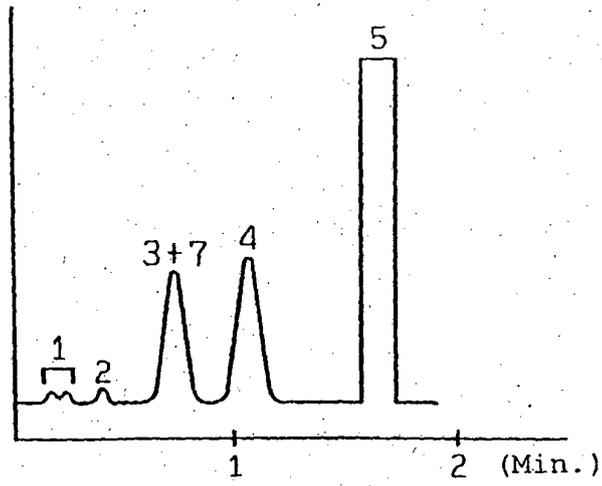


FIG. 16

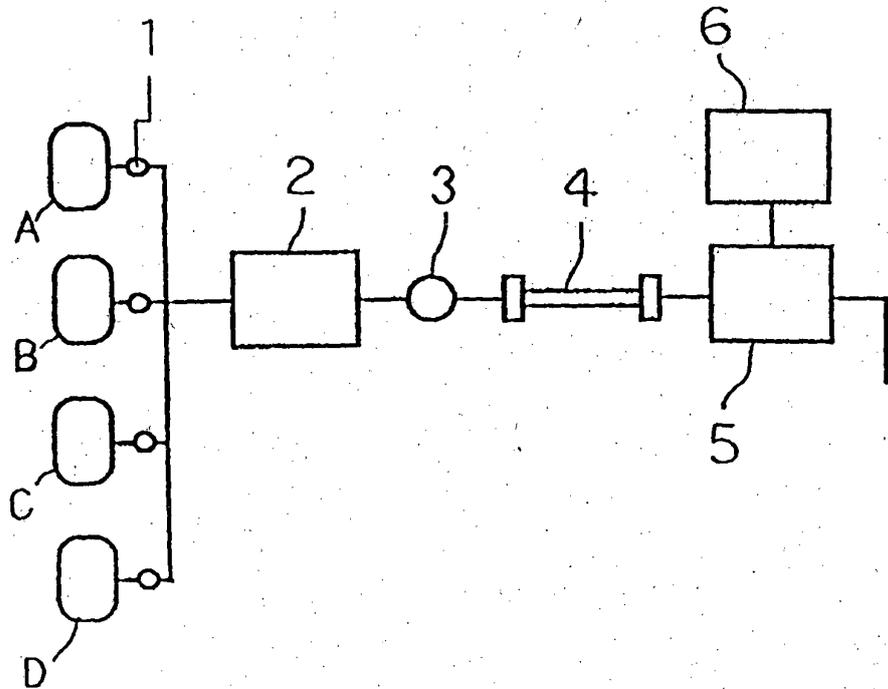


FIG. 17

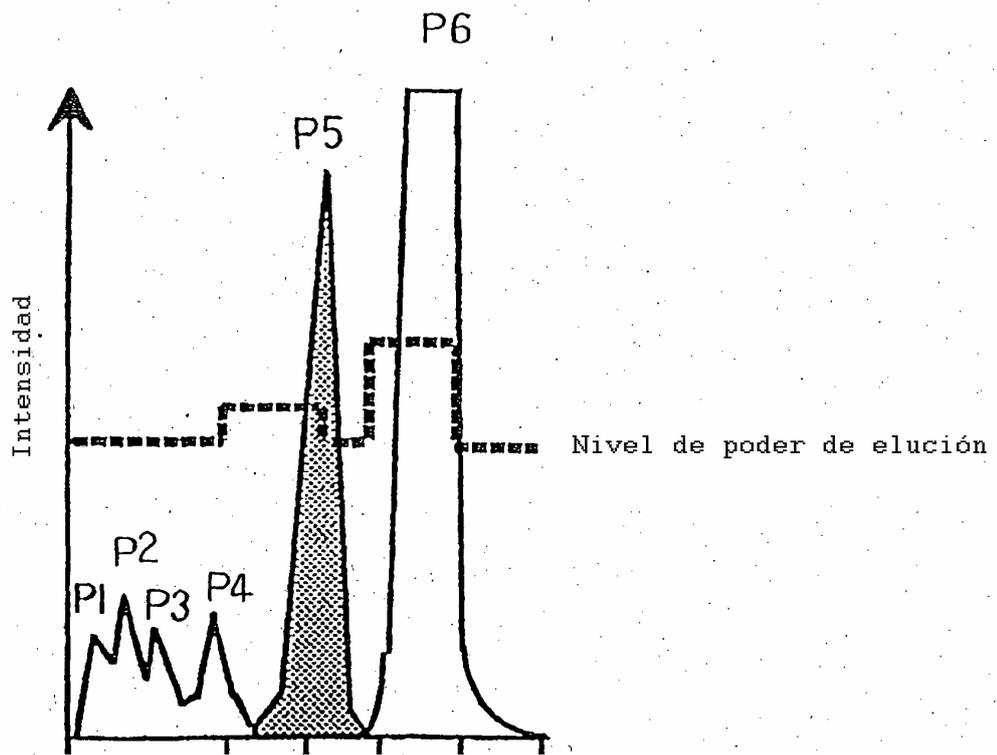


FIG. 18

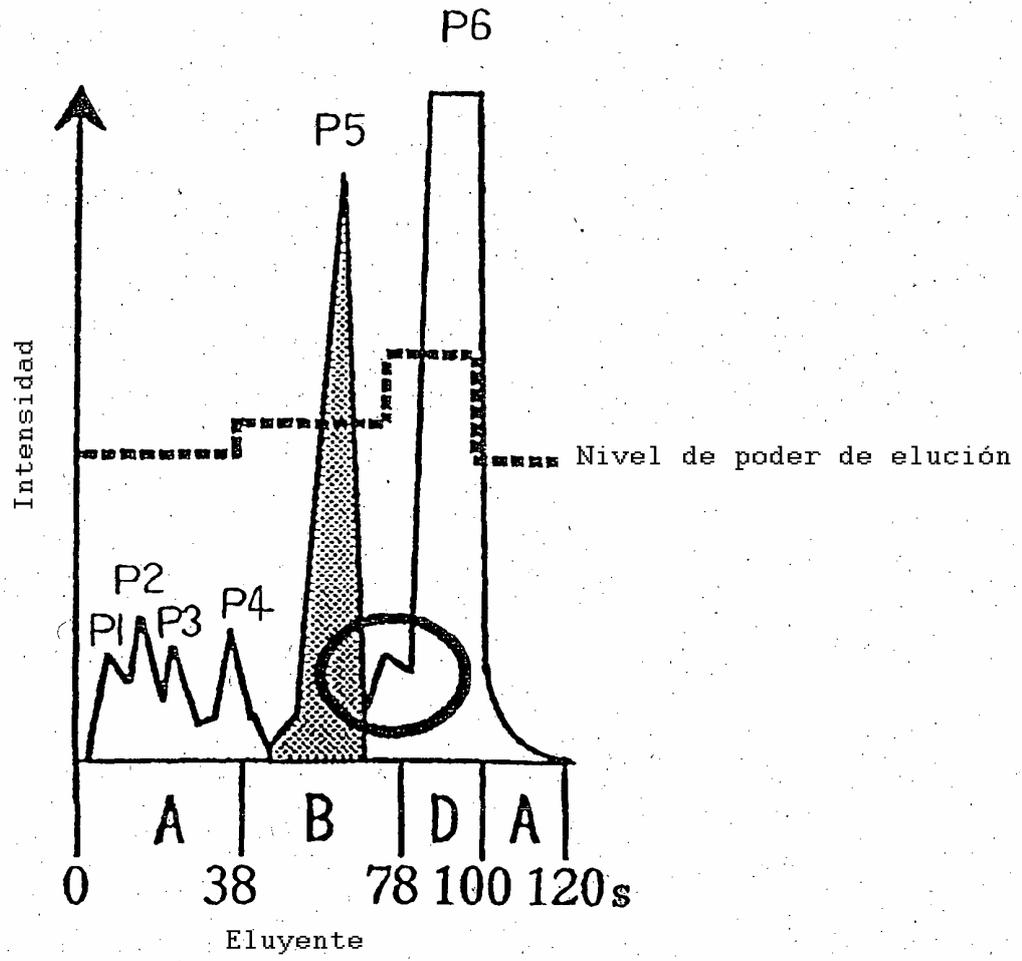


FIG. 19

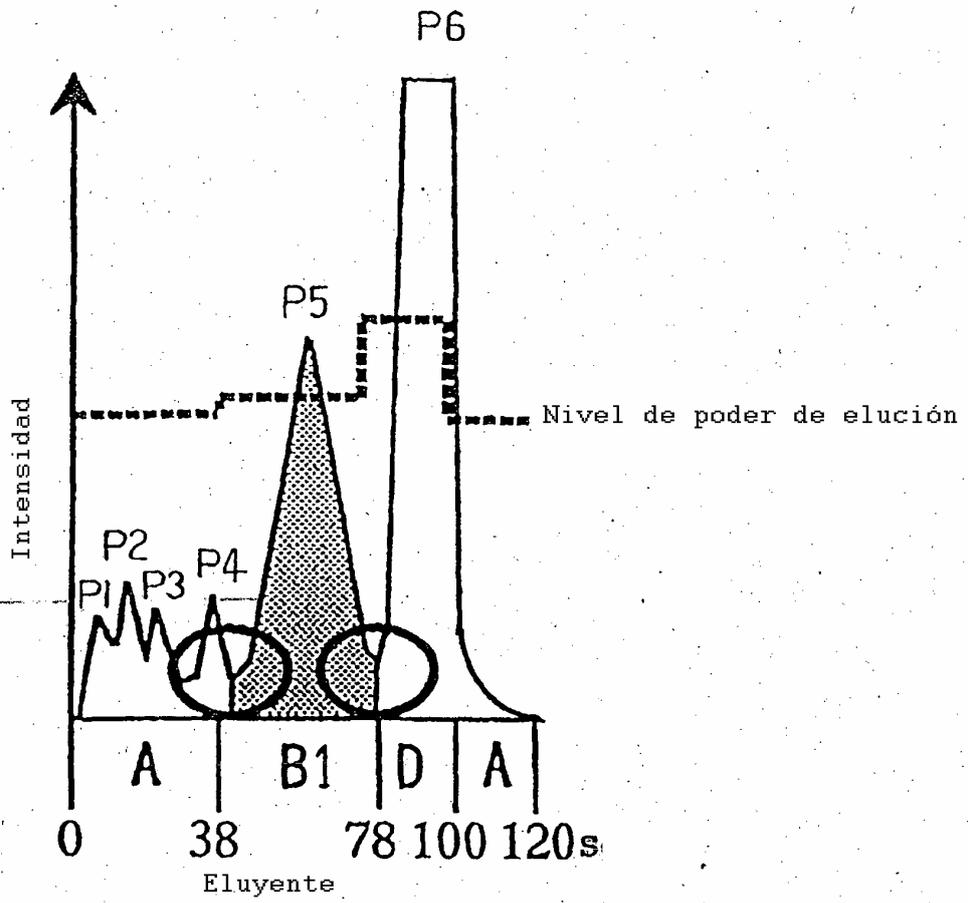


FIG. 20

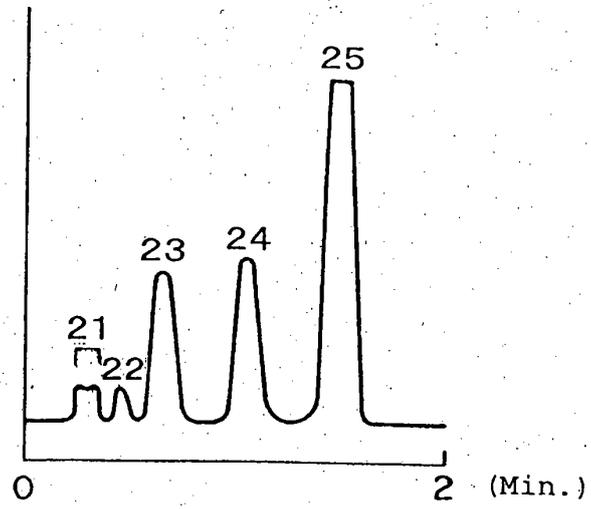


FIG. 21

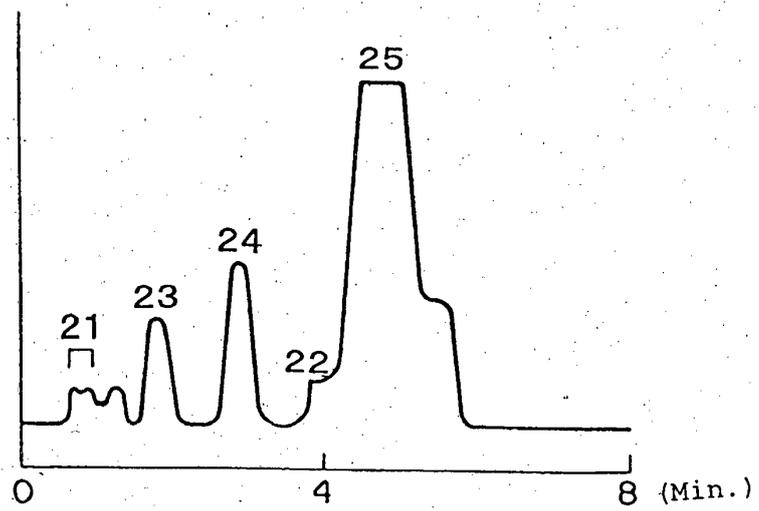


FIG. 22

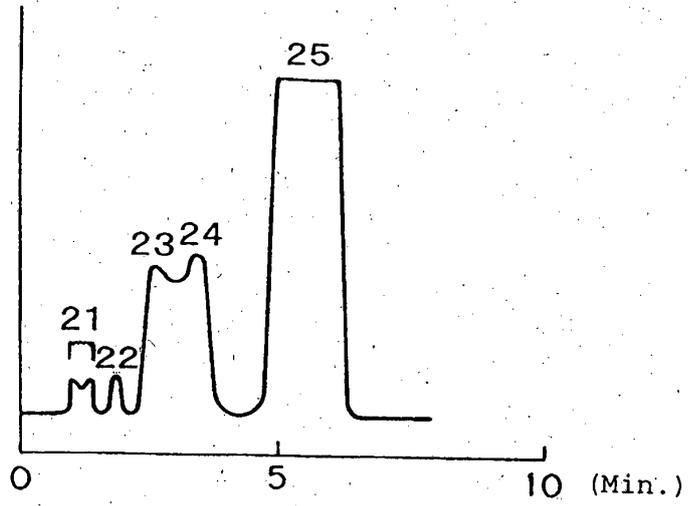


FIG. 23

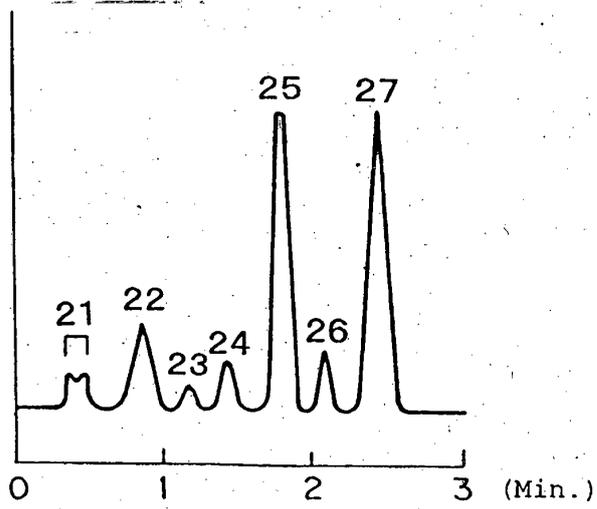


FIG. 24

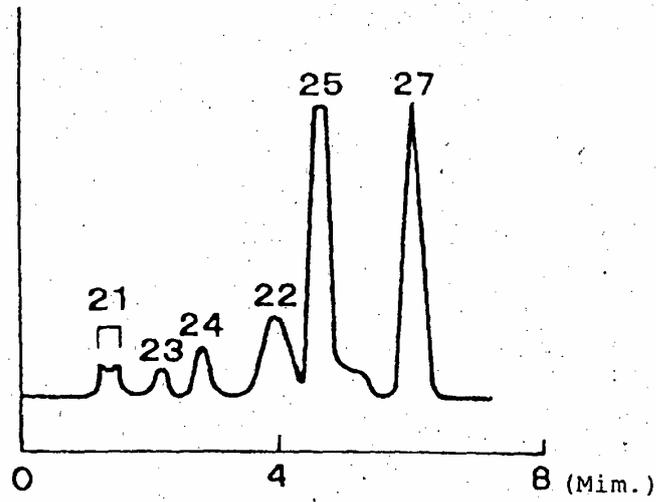


FIG. 25

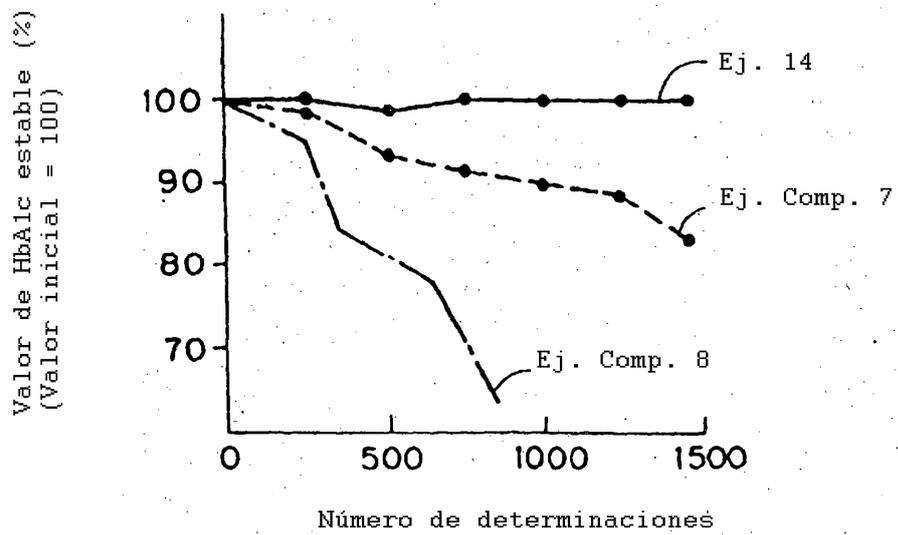


FIG. 26

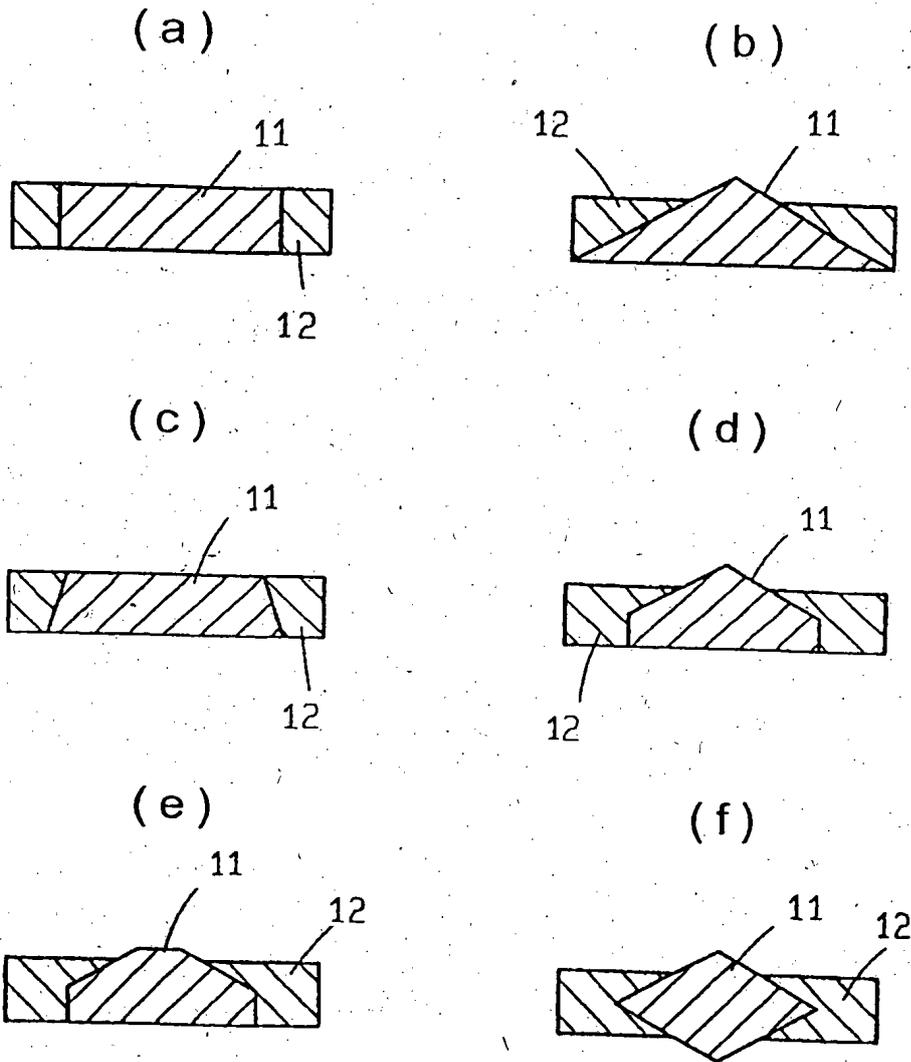


FIG. 27

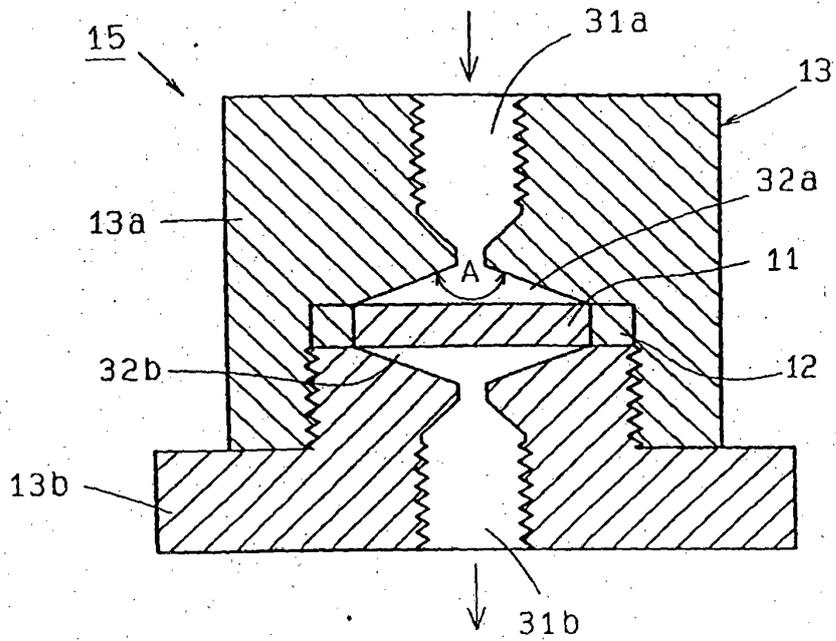


FIG. 28

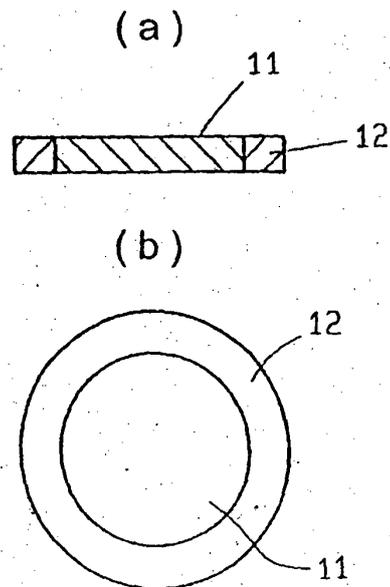


FIG. 29

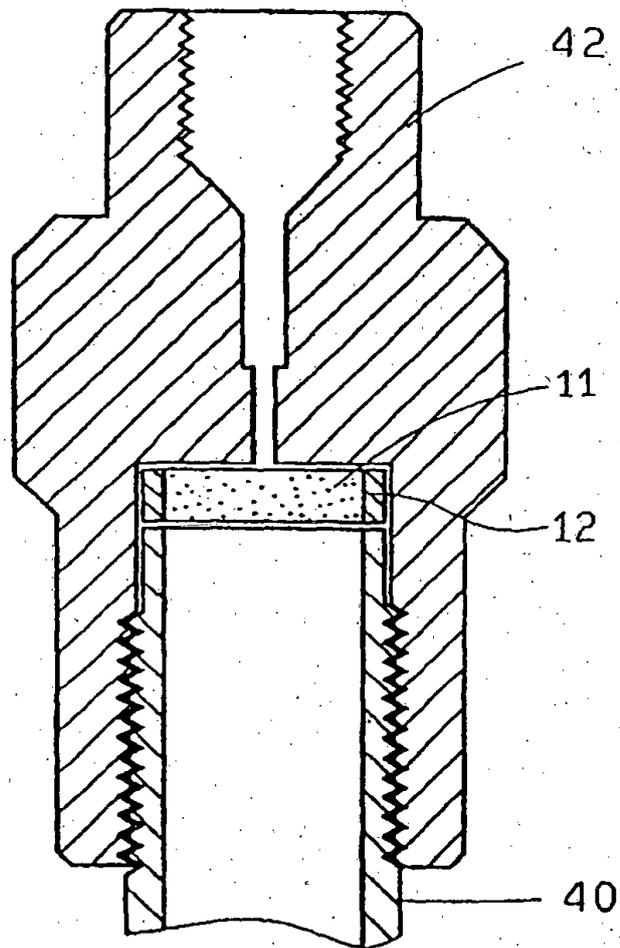
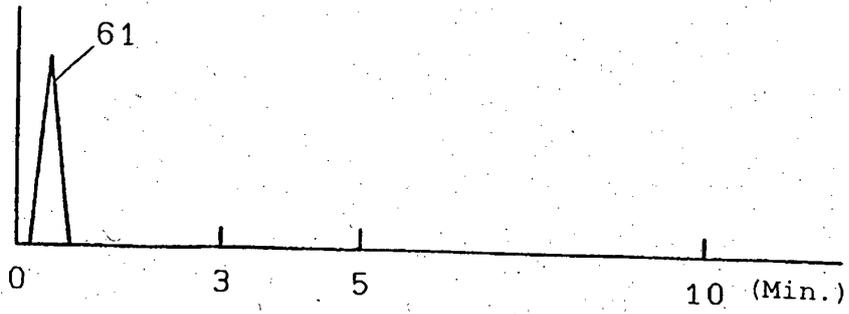
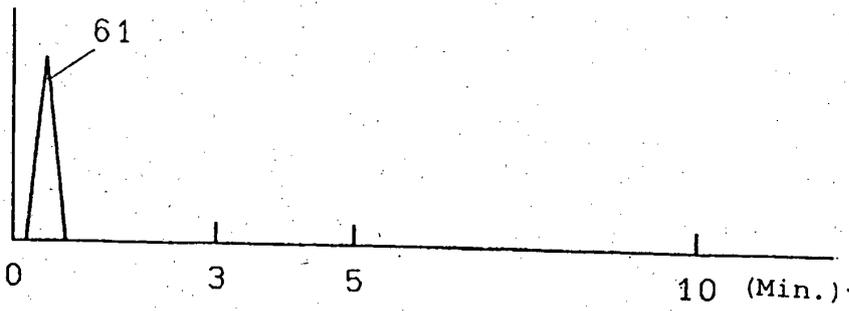


FIG. 30

(a)



(b)



(c)

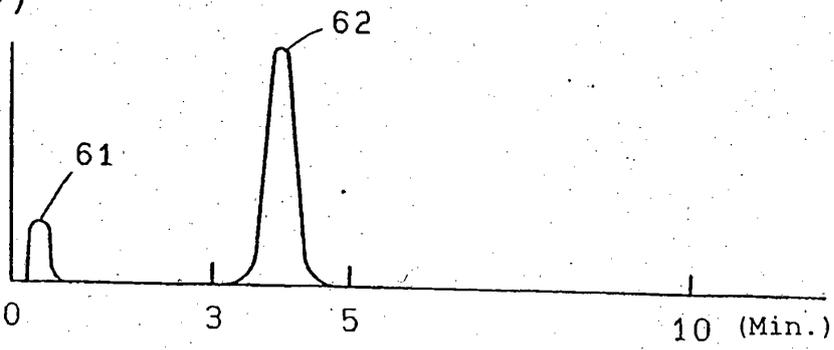


FIG. 31

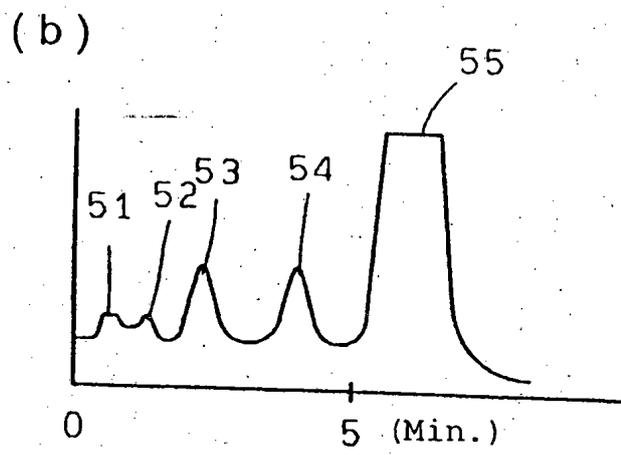
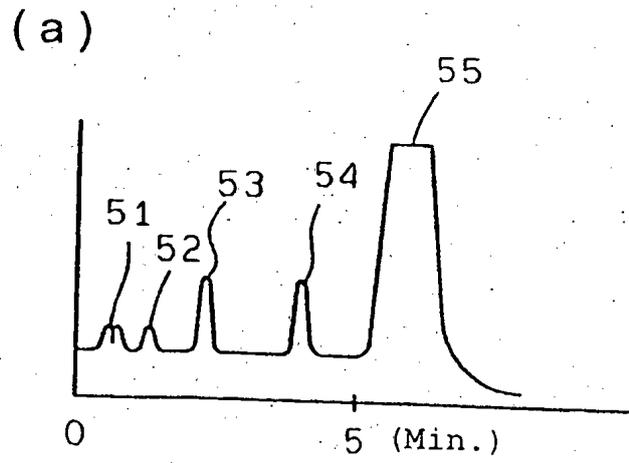


FIG. 32

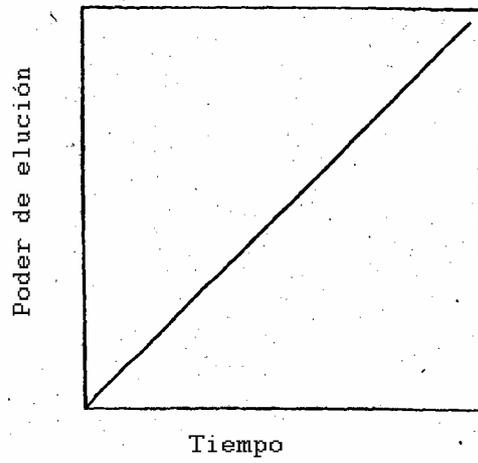


FIG. 33

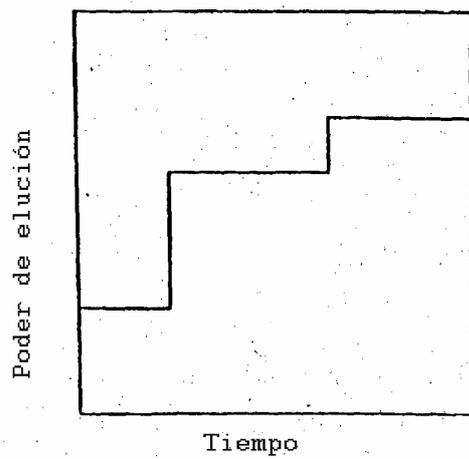


FIG. 34

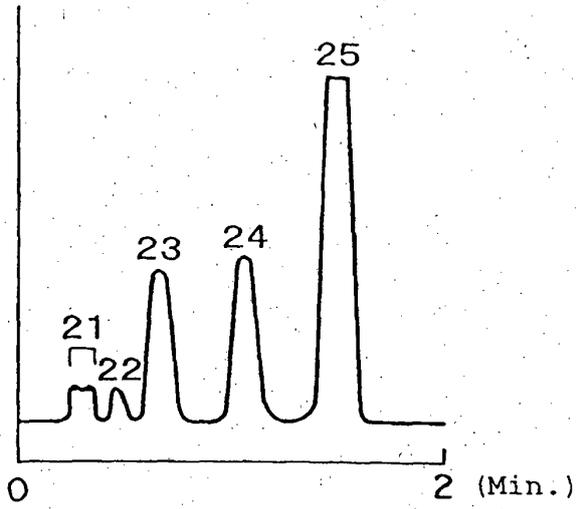


FIG. 35

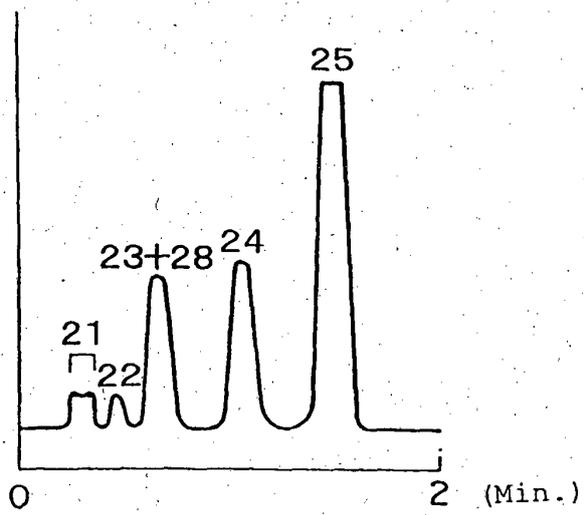


FIG. 36

